

PCT/JP03/11600

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

10.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 6月 4日
Date of Application:

出願番号 特願2003-159975
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP2003-159975]

出願人 石橋 道男
Applicant(s):

REC'D 30 OCT 2003

WIPO PCT

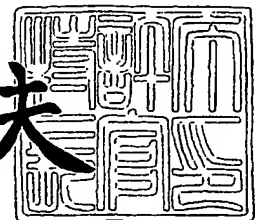
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 I01J1095

【提出日】 平成15年 6月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 35/00

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府堺市庭代台4丁25番16号

 【氏名】 石橋 道男

【特許出願人】

 【識別番号】 500138054

 【氏名又は名称】 石橋 道男

【代理人】

 【識別番号】 100077012

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岩谷 龍

 【電話番号】 06-4796-1300

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 特願2002-265884

 【出願日】 平成14年 9月11日

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 066372

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0006636

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 医薬または化粧品

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 調節型 T リンパ球と再生促進型マクロファージを誘導する化合物を含有することを特徴とするアポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る硬化病変を抑制して、選択的に前記病変を修復再生する医薬組成物または化粧品。

【請求項 2】 (a) 調節型 CD2-CD4+ T リンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型 CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または (b) 調節型 T リンパ球を介さずに再生促進型 CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする腎臓の糸球体病変の予防または／および治療のための医薬。

【請求項 3】 ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型 CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型 CD2-CD4+ T リンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする腎臓の糸球体病変の予防または／および治療のための医薬。

【請求項 4】 (a) 調節型 CD2-CD4+ T リンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型 CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または (b) 調節型 T リンパ球を介さずに再生促進型 CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする皮膚の表皮病変の予防または／および治療のための医薬。

【請求項 5】 ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型 CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型 CD2-CD4+ T リンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする皮膚の表皮病変の予防または／および治療のための医薬。

【請求項 6】 (a) 調節型 CD2-CD4+ T リンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型 CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または (b) 調節型 T リンパ球を介さずに再生促進型 CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変の予防または／および治療のための医薬。

【請求項 7】 ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変の予防または／および治療のための医薬。

【請求項 8】 (a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または (b) 調節型リンパ球を介さずに再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする皮膚の真皮病変の予防または／および治療のための医薬。

【請求項 9】 ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする皮膚の真皮病変の予防または／および治療のための医薬。

【請求項 10】 (a) 請求項 2 または請求項 3 に記載の医薬と、(b) 請求項 6 または請求項 7 に記載の医薬とを併用することを特徴とする腎疾患の予防治療薬。

【請求項 11】 (a) 請求項 4 または請求項 5 に記載の医薬と、(b) 請求項 8 または請求項 9 に記載の医薬とを併用することを特徴とする皮膚疾患の予防治療薬。

【請求項 12】 (a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または (b) 調節型Tリンパ球を介さずに再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする化粧品。

【請求項 13】 ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする化粧品。

【請求項 14】 (a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または (b) 調節型リンパ球を介さずに再生促進型CD11b-CD2+マク

ロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする化粧料。

【請求項 15】 ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする化粧料。

【請求項 16】 (a) 請求項 12 または請求項 13 に記載の化粧料と、(b) 請求項 14 または請求項 15 に記載の化粧料とを併用することを特徴とする化粧料。

【請求項 17】 ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導に対して被検化合物が示す促進作用を測定することを特徴とする、腎臓の糸球体病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 18】 ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導に対して被検化合物が示す促進作用を測定することを特徴とする、皮膚の表皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 19】 ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導に対して被検化合物が示す促進作用を測定することを特徴とする、腎臓の尿細管・間質病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 20】 ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導に対して被検化合物が示す促進作用を測定することを特徴とする、皮膚の真皮病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 21】 (a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) リポ多糖類、さらに所望により (c) ヒトA B型血清または／および (d) RPMI 1640 培地を含むことを特徴とする腎臓の糸球体病変を予防、緩和または治癒できる化合物

のスクリーニング用キット。

【請求項 22】 (a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) マイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞、さらに所望により (c) ヒト AB 型血清または／および (d) RPMI 1640 培地を含むことを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング用キット。

【請求項 23】 (a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) リポ多糖類、さらに所望により (c) ヒト AB 型血清または／および (d) RPMI 1640 培地を含むことを特徴とする皮膚の表皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング用キット。

【請求項 24】 (a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) マイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞、さらに所望により (c) ヒト AB 型血清または／および (d) RPMI 1640 培地を含むことを特徴とする皮膚の真皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臓器組織障害に対して病変選択的な再生促進型免疫担当細胞、すなわち、病変選択的な調節型 T リンパ球と再生促進型マクロファージを誘導することによって、病変選択的に組織障害を引き起こす細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し、アポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る過程を阻止し、病変の修復と再生もたらし、臓器組織の機能を回復温存させ、進行性障害を予防または／および治療することができる医薬および化粧料、ならびに該医薬または化粧料となり得る化合物のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

臓器組織障害は、外傷；高血圧；血行動態の循環不全；阻血再灌流障害；代謝障害；ウイルス、癌もしくは細菌感染症による炎症；拒絶反応；紫外線などの外来ストレスなどさまざま原因により引き起こされる。原因に対する根治的な治療としては、臓器への血行再建術による阻血障害の回避などが挙げられる。しかし

、一般的には、循環器または代謝性疾患では降圧剤や糖代謝改善剤により細胞障害を回避する治療、自己免疫疾患や臓器移植の拒絶反応に対しては免疫抑制療法により組織の温存を図る治療と対症療法がなされている。また、ステロイド剤は多様な作用を有し難治性疾患へは有効であるが、有効な高用量を長期にわたり使用することは副作用の発現から困難となり、進行性の臓器組織障害を進展阻止するには至っていない。

【0003】

一旦壊死に至った細胞組織の場合、その進行は不可逆的であり修復再生は不可能である。現在までのところ、障害を受けた組織細胞の修復再生に対しては、個体が有する組織固有の修復と再生能に期待する以外にないが、障害の程度によっては病変がアポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至り、組織臓器の機能不全に陥る。病変がアポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る過程を制御し、個体の有する修復再生能を引き出すことを目的とした遺伝子治療や再生医学による実験的な研究がなされている段階である。病変に対して選択的に修復再生を誘導し、長期にわたり内服を可能とする医薬はまだ存在していない。

【0004】

個体の有する病変の修復と再生能については、白血球がなんらかの作用を有していることは知られている。たとえば、皮膚創傷治癒の実験的な研究において、マクロファージがなんらかの修復再生に働きを持つことが示唆されている（非特許技術文献1）。また、臓器の再生について、非特許技術文献2のなかで、急性腎不全からの回復過程に腎尿細管の再生に白血球の浸潤が観察されることから、白血球がなんらかの働きを担っていることが示唆されているが、その詳細は明らかでない。

【0005】

本発明者は、臓器障害後の進行性病変に細胞障害型のマクロファージエフェクターが存在し、腎糸球体病変と腎尿細管・間質病変にそれぞれ対応して産生され、その結果、それぞれの病変に対し選択的に病変の進行（悪化）がもたらされること、そして、それぞれの病変に対応するマクロファージエフェクターを選択的に産生阻害する化合物が存在することを示した（特許技術文献1）。

また、非特許文献3には、放射線障害皮膚修復モデルラットにおいて、インターフェロンとTNFの組織内濃度が過剰となっていることが記載されており、さらに、非特許文献4の総説のなかで、皮膚創傷治癒の慢性障害において、インターフェロンが皮膚表皮細胞の再生を阻害し、一方、TNFが皮膚真皮のコラーゲン増生を抑制することが記載されている。このように、皮膚においても、病変選択的に皮膚障害後の進行性病変をもたらす機構が存在することが示唆されている。

しかし、病変に対して選択的に修復再生を誘導する化合物については記載がなく、いまだ明らかにはなっていない。

【0006】

【特許技術文献1】

国際公開第01/72730号パンフレット

【非特許技術文献1】

Cowin AJ, Kallincos N, Hatzirodos N, Robertson JG, Pickering KJ, Couper J, Belford DA. "Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats." Cell Tissue Res 2001, vol.306: p.239-250

【非特許技術文献2】

Manuela Ghielli, Walter A. Verstrepen, Etienne J Nouwen, Marc E De Broe "Inflammatory cells in renal regeneration." Renal Failure, 1996, vol.18, p.355-375

【非特許技術文献3】

M Schaffer, W Weimer, S Wider et al. "Differential expression of inflammatory mediators in radiation-impaired wound healing.", J Surg Res. 107:93-100, 2002

【非特許技術文献4】

VK Rumella, GL Borah. Cytokines, Growth factors, and Plastic surgery. Plast.Reconstr.Surg. 108: 719-733, 2001

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、臓器組織障害に対して病変選択的な再生促進型免疫担当細胞を誘導し病変選択的に修復と再生をもたらすことによる臓器組織障害の予防または／および治療のための医薬を提供することを目的とする。すなわち、病変選択的な調節型Ｔリンパ球と再生促進型マクロファージを誘導することによって、病変選択的に組織障害を引き起こす細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制しアポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る過程を阻止し、病変の修復と再生をもたらす、臓器組織の機能を回復温存させ、臓器組織障害、特に進行性障害を予防または／および治療するための医薬を提供することを目的とする。

【0008】

本発明の他の目的は、修復再生の免疫制御応答を選択的に病変部位に誘導する再生促進型免疫担当細胞、すなわち、再生促進型マクロファージあるいは調節型Ｔリンパ球を病変選択的に誘導する化合物のスクリーニング方法を提供することである。

また、本発明のさらに他の目的は、腎臓の糸球体病変と尿細管・間質病変それぞれに薬効を持つ化合物、すなわち腎臓の糸球体病変と尿細管・間質病変それぞれの組織の修復と再生をもたらす化合物を単独でまたは組み合わせて使用することにより、腎疾患を治療または予防する医薬を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、皮膚表皮の組織障害に対して、表皮細胞やメラノサイトの再生・増殖を誘導することにより、皮膚創傷治癒、色素異常の予防・改善・治療、皮膚の老化の防止もしくは改善などの皮膚表皮病変の予防治療効果を有する医薬もしくは化粧品を提供することである。加えて、皮膚真皮の組織障害に対して、コラーゲン、弾性線維、腺組織の再生・増殖および血管新生を誘導することにより、皮膚創傷治癒、皮膚のハリ回復、色素異常の予防・改善・治療、皮膚の老化の防止もしくは改善などの皮膚真皮病変の予防治療効果を有する医薬もしくは化粧品を提供することである。さらに、これらの医薬もしくは化粧品を併用することによる皮膚疾患の予防治療効果を有する医薬もしくは化粧品を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、臓器障害において組織の再生を促進する働きを有するマクロファージが存在するのではないかという着想のもと、マクロファージのケモカインレセプターや接着分子について研究した。その結果、組織が障害を受けると再生促進型マクロファージが誘導され、病変選択的に組織の修復と再生をもたらすという思いがけない知見を得た。より具体的には、CD11b+CD2+マクロファージは腎臓の糸球体病変の修復と再生に関与し、CD11b-CD2+マクロファージが腎臓の尿細管・間質病変の修復と再生に関与するという知見を得た。さらに、本発明者は、Tリンパ球についても研究したところ、調節型CD2-CD4+Tリンパ球が臓器障害後の組織の修復と再生に関与しているという知見を得た。

【0010】

さらに、本発明者は、腎臓全体の病変を改善するためには、糸球体病変と尿細管・間質病変双方に一致した細胞障害型マクロファージを調整型Tリンパ球の誘導により選択的に抑制し、同時に再生促進型マクロファージを局所病変へ選択的に誘導するという合目的な免疫応答の制御が必要であることを知見した。そして、糸球体病変と尿細管・間質病変それぞれに薬効をもつ化合物を併用して腎疾患を治療する医薬を知見した。

【0011】

従来技術の欄で述べたように、本発明者は、すでに特許技術文献1において、腎糸球体病変と腎尿細管・間質病変それぞれに対応して細胞障害型マクロファージが産生されることを知見しているが、この機構についてさらに検討を加えたところ、腎糸球体病変における細胞障害型マクロファージの産生にはインターフェロンの産生分泌が関与しており、腎尿細管・間質病変における細胞障害型マクロファージの産生にはTNFの産生分泌が関与していることを知見した。すでに述べたように、非特許文献4には、皮膚創傷治癒の慢性障害において、インターフェロンが皮膚表皮細胞の再生を阻害し、TNFが皮膚真皮のコラーゲン増生を抑制することが記載されている。

前記知見と非特許文献4の記載から、腎糸球体病変における病変進行と皮膚の表皮病変における病変進行には、インターフェロンの産生分泌によって誘導され

る細胞障害性マクロファージが関与し、一方で、腎尿細管・間質病変における病変進行と皮膚の真皮病変における病変進行には、TNFの産生分泌によって誘導される細胞障害性マクロファージが関与していると考えられる。そして、病変進行の機構が同じであれば、病変の修復・再生機構も同一であること、すなわち、腎糸球体病変と皮膚の表皮病変とでは同一の修復・再生機構が機能し、一方で、腎尿細管・間質病変と皮膚の真皮病変とでは同一の修復・再生機構が機能していることが十分に考えられる。このような考察のもと、本発明者は、腎臓の糸球体病変の修復と再生に関与するCD11b+CD2+マクロファージが皮膚表皮細胞の修復・再生にも関与し、腎臓の尿細管・間質病変の修復と再生に関与するCD11b-CD2+マクロファージが皮膚真皮細胞の修復・再生にも関与するという思いがけない知見を得た。

本発明者は、さらに検討を重ね、本発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明は、

(1) 調節型Tリンパ球と再生促進型マクロファージを誘導する化合物を含有することを特徴とするアポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る硬化病変を抑制して、選択的に前記病変を修復再生する医薬組成物または化粧料、

(2) (a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型Tリンパ球を介さずに再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする腎臓の糸球体病変の予防または／および治療のための医薬、

(3) ヒト末梢血単核球細胞とリボ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする腎臓の糸球体病変の予防または／および治療のための医薬、

(4) (a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型Tリンパ球を介さずに再生促進型CD11b+CD2+マクロフ

マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする皮膚の表皮病変の予防または／および治療のための医薬、

(5) ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする皮膚の表皮病変の予防または／および治療のための医薬、
に関する。

【0013】

また、本発明は、

(6) (a) 調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型リンパ球を介さずに再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変の予防または／および治療のための医薬、

(7) ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変の予防または／および治療のための医薬、

(8) (a) 調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型リンパ球を介さずに再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする皮膚の真皮病変の予防または／および治療のための医薬、

(9) ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする皮膚の真皮病変の予防または／および治療のための医薬、

(10) (a) 前記(2)または前記(3)に記載の医薬と、(b) 前記(6)または前記(7)に記載の医薬とを併用することを特徴とする腎疾患の予防

治療薬、

(11) (a) 前記(4)または前記(5)に記載の医薬と、(b) 前記(8)または前記(9)に記載の医薬とを併用することを特徴とする皮膚疾患の予防治療薬、
に関する。

【0014】

また、本発明は、

(12) (a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型Tリンパ球を介さずに再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする化粧品、

(13) ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする化粧品、

(14) (a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型リンパ球を介さずに再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする化粧品、

(15) ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする化粧品、

(16) (a) 前記(12)または前記(13)に記載の化粧品と、(b) 前記(14)または前記(15)に記載の化粧品とを併用することを特徴とする化粧品、
に関する。

【0015】

また、本発明は、

(17) ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導に対して

被検化合物が示す促進作用を測定することを特徴とする、腎臓の糸球体病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法、

(18) 被検化合物、リポ多糖類およびヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導し、CD11b+CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の数を測定し、被検化合物が存在しなかったときに比べて、CD11b+CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の増加を検出することを特徴とする前記(17)に記載のスクリーニング法、

(19) (i) リポ多糖類およびヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより細胞障害型マクロファージを誘導し、一方で(ii)被検化合物の存在下にヒト末梢血未分画Tリンパ球をリポ多糖類の添加あるいは無添加にて培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(iii)前記(ii)で得られた未分画Tリンパ球の存在下、前記(i)で得られた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球と接触させたときの細胞障害型マクロファージの産生数を測定し、(iv)被検化合物が存在しなかったときに比べて、細胞障害型マクロファージの産生数の減少を検出することを特徴とする、腎臓の糸球体病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法、

(20) (i) 被検化合物、ヒトAB型血清およびリポ多糖類の存在下にヒト末梢血単核球細胞を培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(ii)誘導された未分画Tリンパ球中の調節型CD2-CD4+Tリンパ球の数を測定し、(iii)被検化合物が存在しなかったときに比べて、調節型CD2-CD4+Tリンパ球の増加を検出することを特徴とする、腎臓の糸球体病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法、
に関する。

【0016】

また、本発明は、

(21) ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導に対して被検化合物が示す促進作用を測定することを特徴とする、皮膚の表皮病変を予防

、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法、

(22) 被検化合物、リポ多糖類およびヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し、CD11b+CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+ Tリンパ球の数を測定し、被検化合物が存在しなかったときに比べて、CD11b+CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+ Tリンパ球の増加を検出することを特徴とする前記(21)に記載のスクリーニング法、

(23) (i) リポ多糖類およびヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより細胞障害型マクロファージを誘導し、一方で(ii)被検化合物の存在下にヒト末梢血未分画Tリンパ球をリポ多糖類の添加あるいは無添加にて培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(iii)前記(ii)で得られた未分画Tリンパ球の存在下、前記(i)で得られた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球と接触させたときの細胞障害型マクロファージの産生数を測定し、(iv)被検化合物が存在しなかったときに比べて、細胞障害型マクロファージの産生数の減少を検出することを特徴とする、皮膚の表皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法、

(24) (i)被検化合物、ヒトAB型血清およびリポ多糖類の存在下にヒト末梢血単核球細胞を培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(ii)誘導された未分画Tリンパ球中の調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の数を測定し、(iii)被検化合物が存在しなかったときに比べて、調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の増加を検出することを特徴とする、皮膚の表皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法、
に関する。

【0017】

また、本発明は、

(25) ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導に対して被検化合物が示す促進作用を測定することを特徴とする、腎臓の尿細管・間質病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスク

リーニング方法、

(26) 被検化合物およびヒトAB型血清の存在下に、ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導し、CD11b-CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の数を測定し、被検化合物が存在しなかったときに比べて、CD11b-CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の増加を検出することを特徴とする前記(25)に記載のスクリーニング方法、

(27) (i) ヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより細胞障害型マクロファージを誘導し、一方で(ii)被検化合物の存在下、ヒト末梢血未分画Tリンパ球をマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞の添加あるいは未添加にて培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(iii)前記(ii)で得られた未分画Tリンパ球の存在下、前記(i)で得られた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球と接触させたときの細胞障害型マクロファージの産生数を測定し、(iv)被検化合物が存在しなかったときに比べて、細胞障害型マクロファージの産生数の減少を検出することを特徴とする、腎臓の尿細管・間質病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスクリーニング方法、

(28) (i)被検化合物およびヒトAB型血清の存在下にマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とヒト末梢血単核球細胞とを培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(ii)誘導された未分画Tリンパ球中の調節型CD2-CD4+Tリンパ球の数を測定し、(iii)被検化合物が存在しなかったときに比べて、調節型CD2-CD4+Tリンパ球の増加を検出することを特徴とする、腎臓の尿細管・間質病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスクリーニング方法、に関する。

【0018】

また、本発明は、

(29) ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-

CD4+Tリンパ球の誘導に対して被検化合物が示す促進作用を測定することを特徴とする、皮膚の真皮病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスクリーニング方法、

(30) 被検化合物およびヒトAB型血清の存在下に、ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導し、CD11b-CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の数を測定し、被検化合物が存在しなかったときに比べて、CD11b-CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の増加を検出することを特徴とする前記(29)に記載のスクリーニング方法、

(31) (i) ヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより細胞障害型マクロファージを誘導し、一方で(ii)被検化合物の存在下、ヒト末梢血未分画Tリンパ球をマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞の添加あるいは未添加にて培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(iii)前記(ii)で得られた未分画Tリンパ球の存在下、前記(i)で得られた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球と接触させたときの細胞障害型マクロファージの産生数を測定し、(iv)被検化合物が存在しなかったときに比べて、細胞障害型マクロファージの産生数の減少を検出することを特徴とする、皮膚の真皮病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスクリーニング方法、

(32) (i) 被検化合物およびヒトAB型血清の存在下にマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とヒト末梢血単核球細胞とを培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(ii)誘導された未分画Tリンパ球中の調節型CD2-CD4+Tリンパ球の数を測定し、(iii)被検化合物が存在しなかったときに比べて、調節型CD2-CD4+Tリンパ球の増加を検出することを特徴とする、皮膚の真皮病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスクリーニング方法、
に関する。

【0019】

また、本発明は、

(33) (a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) リポ多糖類、さらに所望により (c) ヒトAB型血清または／および (d) RPMI 1640 培地を含むことを特徴とする腎臓の糸球体病変を予防、緩和または治療できる化合物のスクリーニング用キット、

(34) (a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) マイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞、さらに所望により (c) ヒトAB型血清または／および (d) RPMI 1640 培地を含むことを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変を予防、緩和または治療できる化合物のスクリーニング用キット、

(35) (a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) リポ多糖類、さらに所望により (c) ヒトAB型血清または／および (d) RPMI 1640 培地を含むことを特徴とする皮膚の表皮病変を予防、緩和または治療できる化合物のスクリーニング用キット、

(36) (a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) マイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞、さらに所望により (c) ヒトAB型血清または／および (d) RPMI 1640 培地を含むことを特徴とする皮膚の真皮病変を予防、緩和または治療できる化合物のスクリーニング用キット、
に関する。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明は、病変に対する選択的な組織障害を引き起こす細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し、アポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る過程を阻止し、病変の局所免疫応答に対して選択的な再生促進型免疫担当細胞、すなわち、調節型Tリンパ球と再生促進型マクロファージを誘導することによって、病変の修復と再生もたらし臓器組織の機能を回復温存させ進行性障害を予防または／および治療するための医薬となり得る化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0021】

前記スクリーニング方法は、調節型Tリンパ球と再生促進型マクロファージの病変に対応した選択的な誘導が、被検化合物の存在により促進されるか否かを測

定することにより行うことができる。

より具体的には、調節型CD2-CD4+ Tリンパ球と再生促進型CD11b+CD2+マクロファージの誘導を被検化合物が促進するか否かを測定することにより、腎臓の糸球体の修復再生を促す化合物をスクリーニングすることができる。前記誘導を促進する化合物は、糸球体病変の予防または／および治療薬となり得る。また、調節型CD2-CD4+ Tリンパ球と再生促進型CD11b+CD2+マクロファージの誘導を被検化合物が促進するか否かを測定することにより、皮膚の表皮細胞またはメラノサイトの修復・再生・増殖を促す化合物をスクリーニングすることができる。前記誘導を促進する化合物は、皮膚の表皮病変の予防または／および治療薬となり得る。なお、再生促進型CD11b+CD2+マクロファージの誘導を被検化合物が促進するか否かのみを測定することによっても、前記化合物をスクリーニングすることはできる。

調節型CD2-CD4+ Tリンパ球と再生促進型CD11b-CD2+マクロファージの誘導を被検化合物が促進するか否かを測定することにより、腎臓の尿細管・間質の修復再生を促す化合物をスクリーニングすることができる。前記誘導を促進する化合物は、腎臓の尿細管・間質病変の予防または／および治療薬となり得る。また、調節型CD2-CD4+ Tリンパ球と再生促進型CD11b-CD2+マクロファージの誘導を被検化合物が促進するか否かを測定することにより、コラーゲン・弾性線維・腺組織の再生もしくは増殖、または血管新生を促す化合物をスクリーニングすることができる。前記誘導を促進する化合物は、皮膚の真皮病変の予防または／および治療薬となり得る。なお、再生促進型CD11b-CD2+マクロファージの誘導を被検化合物が促進するか否かのみを測定することによっても、前記化合物をスクリーニングすることはできる。

【0022】

本発明のスクリーニング方法において使用する被検化合物は、どのようなものでもよく、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液または血漿などであってよく、公知化合物であっても新規化合物であってもよい。

また、複数の被検化合物を同時にスクリーニングし、陽性であった場合にのみ

、個々の化合物について再びスクリーニングを行うなど等公知手段を組み合わせてもよい。

【0023】

本発明のスクリーニング方法を実施するために、調節型Tリンパ球と再生促進型マクロファージを病変に対応して選択的に誘導する方法を以下に述べる。下記方法は、好ましい態様であり、前記誘導方法は下記方法に限定されない。

腎臓の糸球体病変または皮膚の表皮病変を選択的に修復再生する再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球は、リポ多糖類とヒト末梢血単核球細胞を接触させることにより誘導される。また、前記調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導は、次の方法により間接的に観察することができる。リポ多糖類およびヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより細胞障害型マクロファージを誘導し、該誘導させた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球と接触させるとき、同時に自己赤血球とロゼット形成能のない末梢血Tリンパ球を添加することにより、細胞障害型マクロファージの産生数を介して調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を観察することができる。このとき、細胞障害型マクロファージの産生数が少なくなれば、調節型Tリンパ球が誘導されており、その減少の度合いが大きくなるほど調節型Tリンパ球の誘導が促進されている。

【0024】

腎臓の尿細管・間質病変または皮膚の真皮病変を修復再生する再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球は、ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞を接触させることにより誘導される。また、前記調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導は、次の方法により間接的に観察することができる。ヒトAB型血清の存在下に、ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞をRPMI1640培地で培養することにより惹起される細胞障害型マクロファージを誘導し、該誘導させた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球と接触させるとき、同時に自己赤血球とロゼット形成能のない末梢血Tリンパ球を添加することにより、細胞障害型マクロファージの産生数を介して調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を観察することができる。この

とき、細胞障害型マクロファージの産生数が少なくなれば、調節型Tリンパ球が誘導されており、その減少の度合いが大きくなるほど調節型Tリンパ球の誘導が促進されている。

【0025】

上記のように行われ得る調節型Tリンパ球と再生促進型マクロファージの誘導が被検化合物の存在により促進されるか否かは、被検化合物の存在および不存在下で前記誘導を行い、公知の方法により調節型Tリンパ球および再生促進型マクロファージの産生数を測定し、被検化合物が存在していたときの方が被検化合物が存在していなかったときと比べて前記産生数が増加しているか否かにより、判断することができる。前記公知の方法としては、例えばフローサイトメトリーなどが挙げられる。

また、細胞障害型マクロファージの産生数を介して、調節型Tリンパ球の誘導を観察する場合は、被検化合物を存在させる場合の方が、被検化合物を存在させない場合に比べて、細胞障害型マクロファージの産生数が減少していれば、被検化合物は病変の修復と再生もたらす目的とする化合物であると判断できる。

【0026】

本発明のスクリーニング方法の好ましい態様を以下に述べる。

腎臓の糸球体病変または皮膚の表皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法としては、被検化合物、リポ多糖類およびヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球をRPMI 1640培地で培養することにより再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導し、フローサイトメトリーによりCD11b+CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の数を測定し、被検化合物が存在しなかったときに比べて、CD11b+CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の数が増加する化合物をスクリーニングする方法（便宜上、スクリーニング方法Aという。）が挙げられる。

【0027】

前記リポ多糖類としては、自体公知のものをを用いてよい。例えば、サルモネラ菌または大腸菌等のグラム陰性菌由来のリポ多糖類が挙げられる。いわゆるラフ型のものであっても、スムーズ型のものであってもよい。

リポ多糖類の調製には、自体公知の方法を用いてよく、例えば、微生物から抽出し、所望により毒性を除去する処理を行うという方法が挙げられる。微生物からの抽出方法は、例えば、熱フェノール抽出法 (Westphal & Jann., Methods Carbohydr. Chem. 5, 83-89 (1965))、または微生物をラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下でプロテナーゼ K 処理をする方法などを挙げることができる。また、化学的に合成したものをを用いてもよいし、市販のものを適宜用いることもできる。本発明においては、適当な溶媒、好ましくは RPMI 1640 液を用いて溶液としたときに、濃度が約 $60 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度、好ましくは約 $70 \sim 90 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度、より好ましくは約 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の高濃度のものを用いることが好ましい。

【0028】

前記ヒト末梢血単核球細胞は、ヒトの末梢血から自体公知の方法により得ることができる。例えば、ヒトの末梢血から単核球細胞を分離する方法としては、5.7% w/v のフィコール 400 と、9.0% w/v のジアトリゾネイト ナトリウム (Sodium diatrizoate) の水溶液であって比重が $1.077 \text{ g}/\text{ml}$ に調整されたフィコール・パック (Ficoll-Paque、登録商標、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ (Pharmacia Fine Chemicals) 社製) とを用いた遠心分離方法をあげることができる。より具体的には、上記の方法は、(a) 予め決められた量のフィコール・パックを試験管の底に設置する工程、(b) そのまま或いは希釈した血液試料を注意深くフィコール・パック上にピペットで移す工程、(c) フィコール・パックの比重よりも大きい比重を有する血液成分が、フィコール・パック中に進むか、あるいはフィコール・パックを通過するように、(b) で作製したフィコール・パック血液調整物を約 $400 \sim 500 \times g$ で約 $30 \sim 40$ 分間遠心分離する工程、(d) ピペットでフィコール・パックの上方に分離された単核球細胞層を採取する工程からなる。

【0029】

前記 RPMI 1640 培地は、Goding, J. W. (1980) J. Immunol. Methods 39, 285, JAMA 199(1957)519 に記載されている。また、市販品 (Sigma 社製) を用いてもよい。被検化合物、リポ多糖類、ヒト AB 型血清およびヒト末梢血単核球

細胞は、任意の組み合わせの2種または全てを予め混合してから前記培地に加えてもよいし、それぞれを単独で前記培地に加えてもよい。培地に添加する順序は問わない。しかし、より好ましくは、被検化合物、ヒトAB型血清を予め添加したRPMI 1640培地にヒト未処理末梢単核球を添加し、ついでリポ多糖類を添加するのが好ましい。

【0030】

上記スクリーニング方法Aはより具体的には以下のようにして行う。ヒト正常末梢血単核球細胞(peripheral blood mononuclear cell、以下PBMCと略すこともある。)の分離は、比重遠心法により行う。ヘパリン加滅菌シリンジにて約40mlを末梢血から採血し、血液を直ちにEDTA加(100mlあたり1.2mlのEDTA)滅菌冷却生理食塩水を等量入れた50mlプラスチックチューブに入れる。Histopaque d=1.111(Sigma社製)、Ficoll-Paque d=1.078(Pharmacia Biotech社製)を等量ずつ重層したうえに血液を重層して、遠心してPBMC分画を得る。リポ多糖類(lipopolysaccharide、以下LPSと略すこともある。)はSigma L-4391 E-coli由来のものを使用する。被検化合物、ヒトAB正常血清、2mM L-グルタミン、5 μ g/mlゲンタミシン(gentamicin)を含有するRPMI 1640培養液に浮遊させた 2×10^6 PBMCにLPSを80 μ g/mlの濃度になるように添加して、37℃、5%CO₂-95%air下で6日間培養する。このとき被検化合物の濃度は、特に限定されないが、例えば約1 μ M~0.001 μ M程度が好ましく、また種々の濃度の被検化合物を添加することが好ましい。

【0031】

培養後付着細胞をすべて回収し、1%牛アルブミンを加えたHanks液に浮遊させる。フローサイトメトリーには、以下の標識された抗ヒトCD2, CD4, CD11bモノクローナル抗体を使用する。抗ヒトCD2モノクローナル抗体(anti-human CD2 monoclonal antibody, SFCI3Pt2H9 (T11-1), Coulter社製)の抗体にfluorescein isocyanate (FITC製)を標識したもの、抗ヒトCD4モノクローナル抗体(anti-human CD4-allophycocyanin標識抗体、Beckton Dickinson, Immunocytometry Systems社製)、抗ヒトCD11bモノクローナル抗体(an

ti-human CD11b monoclonal antibody, clone 44 GenzymeTechme社製) にphycoerythrinを標識したものを使用する。FACScanにて、CD11b+CD2+単球マクロファージ分画、CD2-CD4+Tリンパ球分画を測定し、被検化合物を加えたときに20%以上の分画が増加した化合物を陽性と判断する。

【0032】

腎臓の尿細管・間質病変または皮膚の真皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法としては、被検化合物およびヒトAB型血清の存在下に、ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞をRPMI 1640培地で培養することにより再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導し、フローサイトメトリーによりCD11b-CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の数を測定し、被検化合物が存在しなかったときに比べて、CD11b-CD2+マクロファージおよびCD2-CD4+Tリンパ球の数が増加する化合物をスクリーニングする方法（便宜上、スクリーニング方法Bという。）が挙げられる。

【0033】

前記マイトマイシン処理ヒト末梢単核球細胞は、例えば上記のような公知方法を用いて得られたヒト末梢単核球細胞に、マイトマイシンの最終濃度が約40 μ g/mL程度となるように添加し、約37℃程度で約20分程度加熱処理することにより得ることができる。

【0034】

スクリーニング方法Bは、より具体的には上記スクリーニング方法Aと全く同様にして行うことができる。しかし、LPSの代わりに、マイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞を、ヒト末梢血単核球細胞と同じ細胞数を加えて培養する。すなわち、被検化合物、ヒトAB正常血清、2mM L-グルタミン、5 μ g/mL gentamicinを含むRPMI 1640培養液に、 2×10^6 PBMCおよび 2×10^6 マイトマイシン処理PBMCを浮遊させて、37℃、5% CO₂-95% air下で6日間培養する。培養条件とフローサイトメトリーで使用する標識抗体は上記スクリーニング方法Aと同じであり、陽性化合物の判定も同じく実施する。

【0035】

腎臓の糸球体病変または皮膚の表皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法の他の好ましい態様としては、(i) リポ多糖類およびヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞をRPMI 1640培地で培養することにより細胞障害型マクロファージを誘導し、一方で(ii) 被検化合物の存在下にヒト末梢血未分画Tリンパ球をリポ多糖類の添加あるいは無添加にて培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(iii) 前記(ii)で得られた未分画Tリンパ球の存在下、前記(i)で得られた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球と接触させたときの細胞障害型マクロファージの産生数を測定し、(iv) 被検化合物が存在しなかったときに比べて、細胞障害型マクロファージの産生数を減少させる化合物をスクリーニングするという方法(便宜上、スクリーニング方法Cという。)が挙げられる。

【0036】

具体的には、下記工程にしたがって行うことができる。

(a) 細胞障害型マクロファージの誘導について以下に述べる。ヒトAB正常血清、2 mM L-グルタミン、5 μ g/ml ゲンタミシン (gentamicin) を含有するRPMI 1640培養液に浮遊させた 2×10^6 PBMCにLPSを80 μ g/mlの濃度になるように添加して、37℃、5%CO₂-95%air下で6日間培養し、細胞障害型マクロファージを誘導する。なお、前記PBMCはスクリーニング方法Aと同様にして得ることができる。誘導された細胞障害型マクロファージを培養液から回収する。回収には公知方法を用いてよいが、例えばrubber-policemanゴムへらを用いて付着したものを回収するという方法が挙げられる。その後洗浄を行ってもよい。洗浄には、ゲンタミシン約5 μ g/mLを添加したHanks液を用いるのが好ましい。

【0037】

(b) 未分画Tリンパ球の誘導について以下に述べる。まず、ヒト末梢血未分画Tリンパ球を以下のようにして分離する。スクリーニング方法Aで述べたように比重遠心法により分離したPBMC分画に、ノイラミニダーゼ処理したヒツジ赤血球を加え37℃20分反応した液を静かにPercoll不連続比重層を作成した

チューブに加え、 $400 \times g$ にて20分室温にて遠心する。Percoll不連続比重層に、ロゼット形成したTリンパ球分画と、 $d = 1.091$ 以上の層に浮遊する単球分画をそれぞれ採取する。ロゼット形成したTリンパ球分画に塩化アンモニウムを加えヒツジ赤血球を溶血させTリンパ球分画を得る。同時に採取された単球分画を洗浄して得る。

ついで、被検化合物の存在下、分離したヒト末梢血未分画Tリンパ球にリポ多糖類を添加あるいは添加せずに培養することにより、未分画Tリンパ球を誘導させることができる。具体的には、ヒトAB正常血清、2 mM L-グルタミン、 $5 \mu g/ml$ ゲンタミシン (gentamicin) および所望によりリポ多糖類を含有するRPMI 1640培養液で、ヒト末梢血未分画Tリンパ球を、 $37^\circ C$ 、5% CO_2 -95% air下で、6日間培養する。誘導された未分画Tリンパ球を培養液から回収する。回収には公知方法を用いてよいが、例えばrubber-policemanゴムへらを用いて付着したものを回収するという方法が挙げられる。

【0038】

(c) 前記 (a) で得られた細胞障害型マクロファージと、前記 (b) で得られた未分画Tリンパ球とを用いて、SPFC法により被検化合物の組織再生能について評価する。

SPFC法について以下に示す。前記 (b) で得られた未分画Tリンパ球の存在下、前記 (a) で得られた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球に接触させることにより産生されるSpontaneous Plaque-Forming Cell (以下、SPFCという) の数を測定することにより行うのが好ましい。

【0039】

まず、単層化された自己赤血球を作成する。単層化された赤血球は自体公知の方法を用いて作成してよいが、以下の方法が好ましい。自己赤血球を血清添加のないHank's液にて約4%濃度とする。自己赤血球は、上述した公知方法により得られる自己赤血球を約0.1重量%のAB血清添加したリン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBSと略す) を用いて約 $4^\circ C$ で保存したものを使用するのが好ましい。ポリ-L-リジンをTerasakiプレートに加え約 $37^\circ C$ 程度で、約20分程度処理しPBSにて洗浄後直ちに上記自己赤血球を添加し、約 $37^\circ C$ で約30分置

き付着していない赤血球を除去し、単層化した自己赤血球を付着したTerasakiプレートを得る。

前記 (a) で得られた細胞障害型マクロファージを含む培養P BMCを約 2×10^6 個/mL程度になるようにゲンタミシン約 $5 \mu\text{g/mL}$ 程度を添加したHanks液を添加し細胞数濃度を調整する。

【0040】

ついで、上記単層化した自己赤血球付着したTerasakiプレートのwellに約 1×10^4 個の (a) で得られた細胞障害型マクロファージを添加する。同時に、(b) で得られた未分画培養Tリンパ球も加える。この培養Tリンパ球のなかに細胞障害型マクロファージによるSPFC活性を阻害する調節型Tリンパ球が產生されているかを判定するために、(a) で得られた細胞障害型マクロファージと同数の (b) で得られた未分画培養Tリンパ球を加えた場合、および (a) で得られた細胞障害型マクロファージの $1/5$ の数の (b) で得られた未分画培養Tリンパ球を加えた場合の二段階の細胞数比を設定する。最後にHanks液を $1 \sim 10 \mu\text{L}$ 添加し、約 37°C 程度で約2時間静置する。反応終了後はホルマリンで固定するのが好ましい。SPFC産生数は、位相差顕微鏡にて容易に測定できる。SPFC産生数が抑制されたかは、被検化合物は加えずに溶媒のみを用いて同一の操作を行い、被検化合物を添加した場合と比較して、抑制率%を算定する。50%以上の抑制を呈する化合物を陽性と判定する。

【0041】

腎臓の尿細管・間質病変または皮膚の真皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法の他の好ましい態様としては、(i) ヒトAB型血清の存在下にヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞をRPMI 1640培地で培養することにより細胞障害型マクロファージを誘導し、一方で(ii) 被検化合物の存在下、ヒト末梢血未分画Tリンパ球をマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞の添加あるいは未添加にて培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(iii) 前記(ii) で得られた未分画Tリンパ球の存在下、前記(i) で得られた細胞障害型マクロファージを単層化した自己赤血球と接触させたときの細胞障害型マクロファージの産生数を測定し、(iv) 被検化

化合物が存在しなかったときに比べて、細胞障害型マクロファージの産生数を減少させる化合物をスクリーニングするという方法（便宜上、スクリーニング方法Dという。）が挙げられる。

具体的に、本スクリーニング方法は、LPSの代わりに、マイトマイシン処理PBMCを用いる以外は、前記スクリーニング方法Cと全く同様に行えばよい。

【0042】

腎臓の糸球体病変または皮膚の表皮病変を予防、緩和または治癒できる化合物のスクリーニング方法のさらに他の好ましい態様としては、(i)被検化合物、ヒトAB型血清およびリポ多糖類の存在下にヒト末梢血単核球細胞を培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(ii)誘導された未分画Tリンパ球中の調節型CD2-CD4⁺Tリンパ球の数をフローサイトメトリーにより測定し、(iii)被検化合物が存在しなかったときに比べて、調節型CD2-CD4⁺Tリンパ球の数を増加させる化合物をスクリーニングするという方法（便宜上、スクリーニング方法Eという。）が挙げられる。

具体的に、本スクリーニング方法は、上記スクリーニング方法A～Dに従って行えばよい。

【0043】

腎臓の尿細管・間質病変または皮膚の真皮病変を予防、緩和もしくは治癒できる化合物のスクリーニング方法のさらに他の好ましい態様としては、(i)被検化合物およびヒトAB型血清の存在下にマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とヒト末梢血単核球細胞を培養することにより未分画Tリンパ球を誘導し、(ii)誘導された未分画Tリンパ球中の調節型CD2-CD4⁺Tリンパ球の数をフローサイトメトリーにより測定し、(iii)被検化合物が存在しなかったときに比べて、調節型CD2-CD4⁺Tリンパ球の数を増加させる化合物をスクリーニングするという方法（便宜上、スクリーニング方法Fという。）が挙げられる。

具体的に、本スクリーニング方法は、上記スクリーニング方法A～Dに従って行えばよい。

【0044】

また、本発明は、上記本発明にかかるスクリーニング方法を実施するためのス

クリーニング用キットも提供する。該スクリーニング用キットの形式は特に問わず、自体公知の形式を用いてもよい。

腎臓の糸球体病変または皮膚の表皮病変を予防または／および治癒することができる化合物をスクリーニングする際に、好ましいスクリーニング用キットの態様としては、(a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) リポ多糖類を含むキットが挙げられる。本キットは、前記 (a) および (b) 以外のもの、例えば、(c) ヒト AB 型血清または／および (d) RPMI 1640 培地などを含んでいてもよい。

腎臓の尿細管・間質病変または皮膚の真皮病変を予防または／および治癒することができる化合物をスクリーニングする際に、好ましいスクリーニング用キットの態様としては、(a) ヒト末梢血単核球細胞および (b) マイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞を含むキットが挙げられる。本キットは、前記 (a) および (b) 以外のもの、例えば、(c) ヒト AB 型血清または／および (d) RPMI 1640 培地などを含んでいてもよい。

【0045】

本発明は、調節型 T リンパ球と再生促進型マクロファージを誘導する化合物を含有することを特徴とするアポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る硬化病変を抑え、選択的に前記病変を修復再生する医薬組成物を提供する。

前記医薬組成物の一態様として、(a) 調節型 CD2-CD4⁺ T リンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型 CD11b⁺CD2⁺マクロファージを優位に増加させるか、または (b) 調節型 T リンパ球を介さずに再生促進型 CD11b⁺CD2⁺マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする腎臓の糸球体病変の予防または／および治療のための医薬（以下、腎臓の糸球体病変の予防治療薬と略称する。）が挙げられる。なかでも、前記医薬の好ましい態様としては、ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型 CD11b⁺CD2⁺マクロファージおよび調節型 CD2-CD4⁺ T リンパ球の誘導を促進する化合物を含有する医薬が挙げられる。

【0046】

前記医薬組成物の他の態様として、(a) 調節型 CD2-CD4⁺ T リンパ球を誘導し

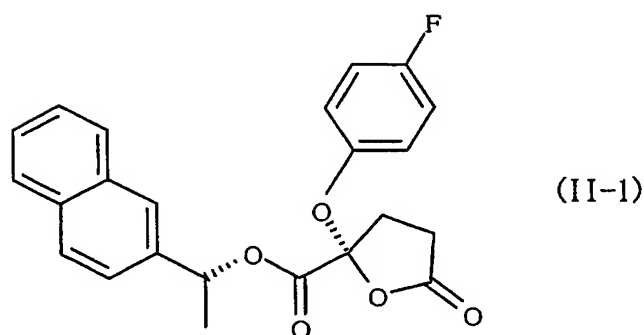
細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または（b）調節型Tリンパ球を介さずに再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする皮膚の表皮病変の予防または／および治療のための医薬（以下、皮膚の表皮病変の予防治療薬と略称する。）が挙げられる。なかでも、前記医薬の好ましい態様としては、ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有する医薬が挙げられる。

皮膚の表皮病変の予防治療薬は、より具体的には、メラノサイトもしくは表皮細胞、特に表皮角化細胞の増殖促進作用または表皮細胞機能の正常化作用を有し、切り傷の治療、やけど等のひび割れ、あかぎれ、ただれなどの創傷治癒促進；こじわ、くすみ、色素沈着、肌荒れなどの皮膚老化の防止または改善に使用することができる。

【0047】

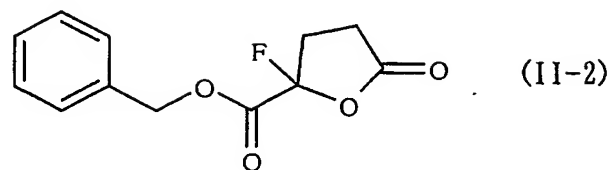
腎臓の糸球体病変の予防治療薬または皮膚の表皮病変の予防治療薬に含まれる化合物は、上記スクリーニング方法により得ることができる。具体的に、前記医薬に含まれる化合物としては、例えば下記式（II-1）；

【化1】



で示される化合物、
下記式（II-2）；

【化 2】

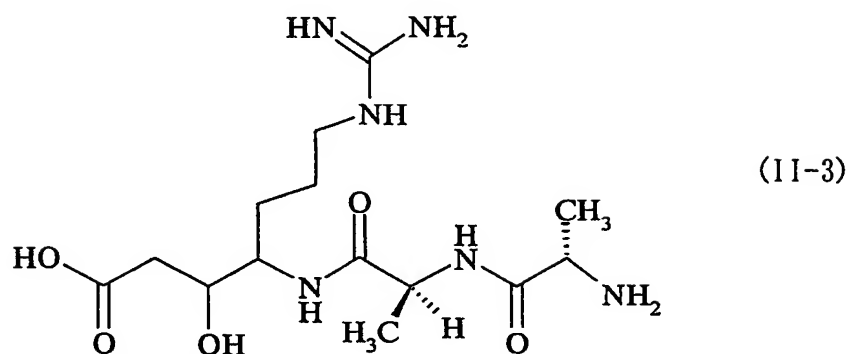


で示される化合物、

【0048】

下記式 (II-3) ;

【化 3】

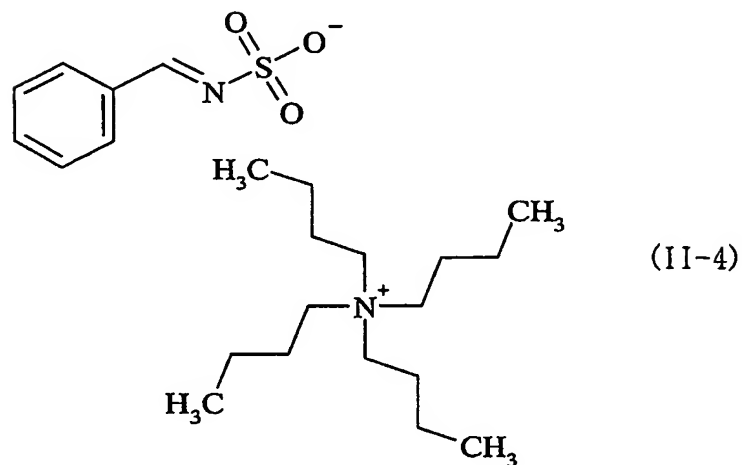


で示される化合物、

【0049】

下記式 (II-4) ;

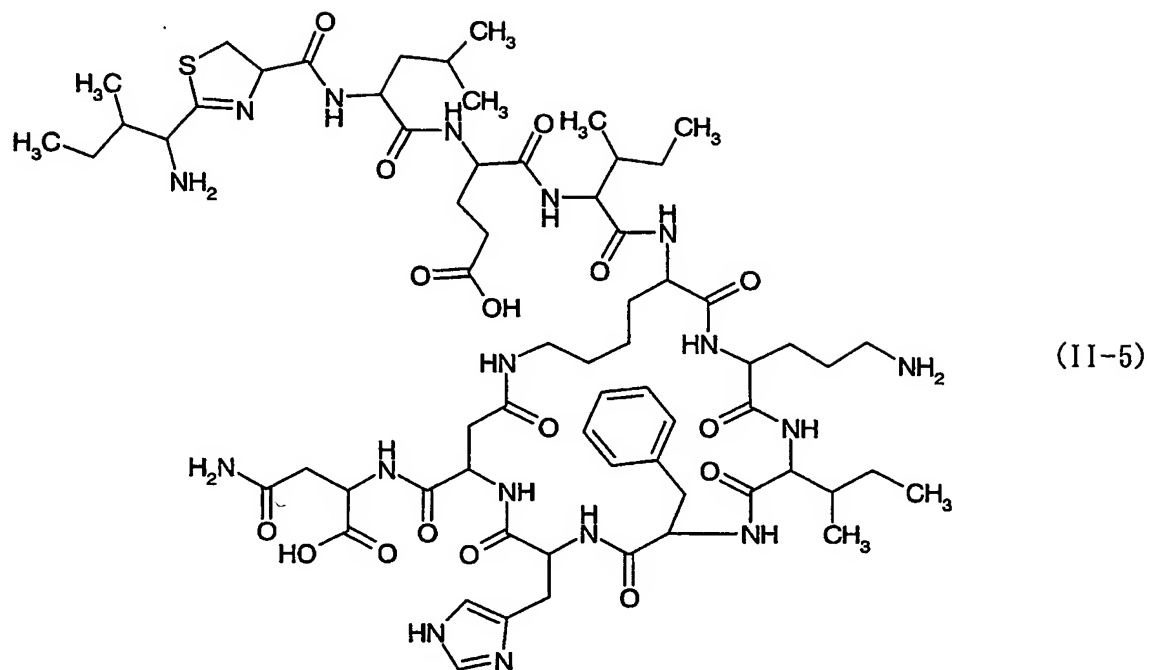
【化 4】



で示される化合物、

下記式 (II-5) ;

【化 5】

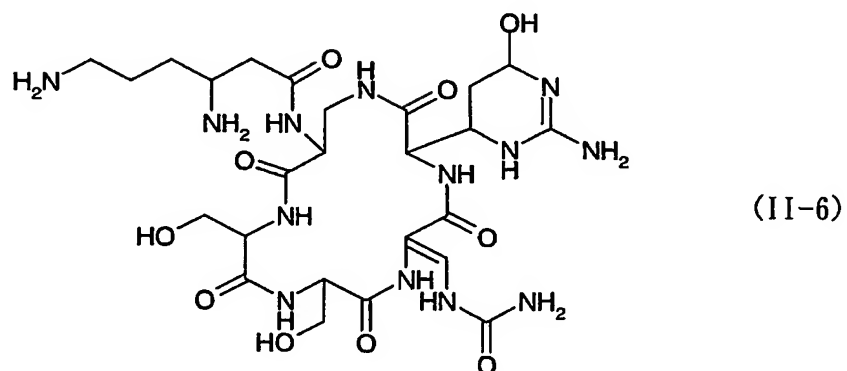


で示される化合物、

【0050】

下記式 (II-6) ;

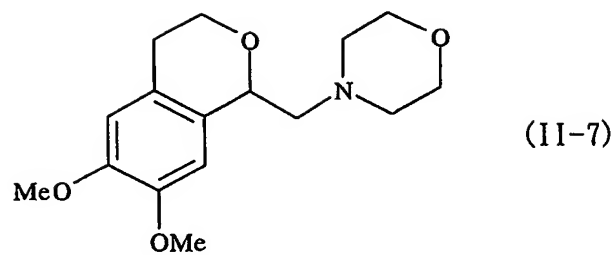
【化 6】



で示される化合物、

下記式 (II-7) ;

【化7】



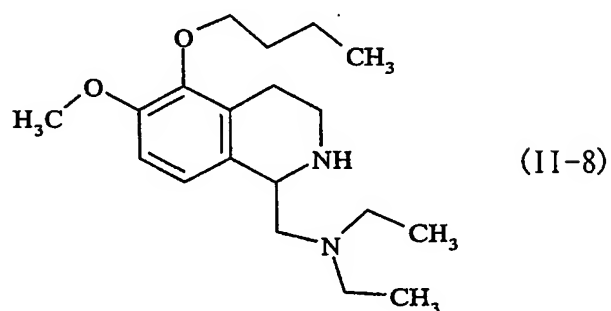
(式中、Me はメチル基を表す。)

で示される化合物、

【0051】

下記式 (II-8) ;

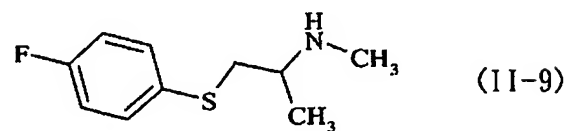
【化8】



で示される化合物、

下記式 (II-9) ;

【化9】

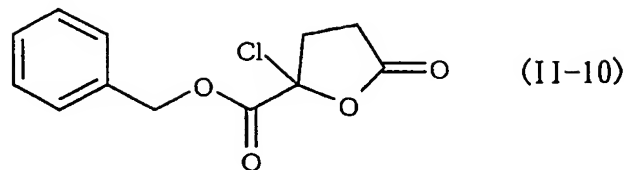


で示される化合物、

【0052】

下記式 (II-10) ;

【化10】

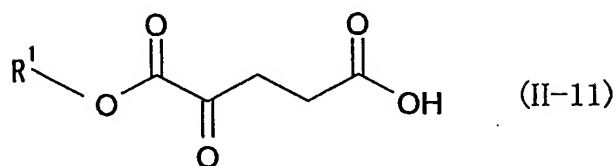


で示される化合物、

【0053】

または、下記式 (II-11) ;

【化11】



(式中、R¹ は炭素数 6 ~ 14 のアリール基、炭素数 7 ~ 16 のアラルキル基を表す。)

で示される化合物、

が挙げられる。

【0054】

式 (II-11) で表される化合物において、置換基 R¹ としての炭素数 6 ~ 14 のアリール基には、例えば、フェニル基、ベンジル基、ビフェニル基、インデニル基、ナフチル基またはそれらの一部飽和体である例えば 2, 3-ジヒドロインデニル基もしくは 1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフチル基などが含まれる。置換基 R¹ としての炭素数 7 ~ 16 のアラルキル基には、例えば、ベンジル基、フェネチル基、フェニルプロピル基、フェニルブチル基又はフェニルヘキシル基等が含まれる。置換基 R¹ としてはベンジル基が好ましい。

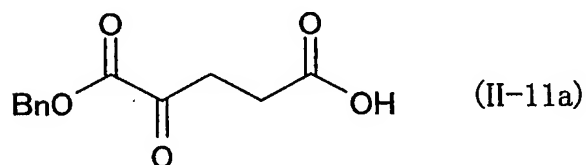
これら炭素数 6 ~ 14 のアリール基または炭素数 7 ~ 16 のアラルキル基は、化学的に許容される範囲で置換基を有していてもよく、該置換基としては、例えば、ハロゲン (好ましくは、フッ素、塩素、臭素)、オキシ基、アルカノイル基 (好ましくは C₁ ~ 8)、アルカノイルオキシ基 (好ましくは C₁ ~ 8)、アル

カノイルアミノ基（好ましくはC₁～8）、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基（好ましくはC₂～8）、ハロアルキルカルボニル基（好ましくはC₂～8）、アルコキシ基（好ましくはC₁～8）、ハロアルコキシ基（好ましくはC₁～8）、アルキル基（好ましくはC₁～20）、アミノ基、アルキルアミノ基（好ましくはC₁～8）、ジアルキルアミノ基（好ましくはC₂～16）、環状アミノ基、アルキルアミノカルボニル基（好ましくはC₂～8）、カルバモイル基、水酸基、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、アルキルチオ基（好ましくはC₁～8）、アルキルスルホニルオキシ基（好ましくはC₁～8）、アルキルスルホニルアミノ基（好ましくはC₁～8）、またはフェニル基等が挙げられる。

【0055】

前記腎臓の糸球体病変の予防治療薬または皮膚の表皮病変の予防治療薬に含まれる化合物としては、特に、下記式 (II-11a) ;

【化 1 2】



(式中、B_nはベンジル基を表す。)

で示される化合物またはその薬理学的に許容される塩が好ましい。

【 0 0 5 6 】

前記医薬組成物の他の態様として、（a）調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または（b）調節型リンパ球を介さずに再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変の予防または／および治療のための医薬（以下、腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬と略称する。）が挙げられる。前記医薬に含まれる化合物は、上記スクリーニング方法により得ることができる。なかでも、前記医薬の好ましい態様としては、ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファ

ージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変の予防または／および治療のための医薬が挙げられる。

【0057】

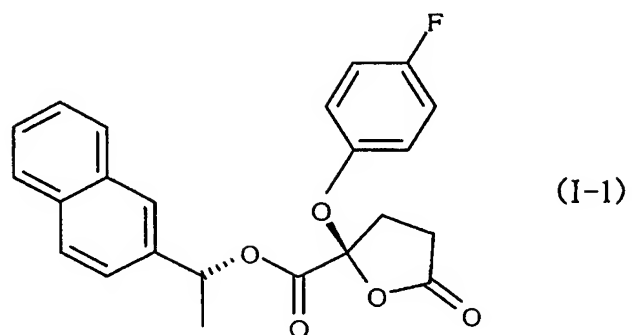
前記医薬組成物のさらに他の態様として、(a) 調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型リンパ球を介さずに再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする皮膚の真皮病変の予防または／および治療のための医薬（以下、皮膚の真皮病変の予防治療薬と略称する。）が挙げられる。前記医薬に含まれる化合物は、上記スクリーニング方法により得ることができる。なかでも、前記医薬の好ましい態様としては、ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする皮膚の真皮病変の予防または／および治療のための医薬が挙げられる。

本発明の皮膚の真皮病変の予防治療薬は、より具体的には、真皮線維芽細胞におけるコラーゲン合成促進作用、真皮線維芽細胞の代謝活性化作用、弾性線維もしくは腺組織の再生・増殖促進作用または血管新生誘導作用を有し、切り傷の治療、やけど等のひび割れ、あかぎれ、ただれなどの創傷治癒促進；こじわ、くすみ、色素沈着、肌荒れなどの皮膚老化の防止または改善；皮膚のハリの向上に使用することができる。

【0058】

前記腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬または皮膚の真皮病変の予防治療薬に含まれる化合物としては、例えば下記式(I-1)；

【化13】

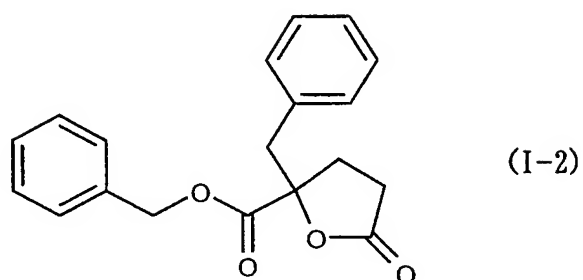


で示される化合物、

【0059】

下記式 (I-2) ;

【化14】

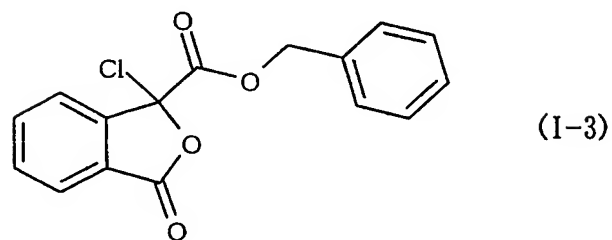


で示される化合物、

【0060】

下記式 (I-3) ;

【化15】

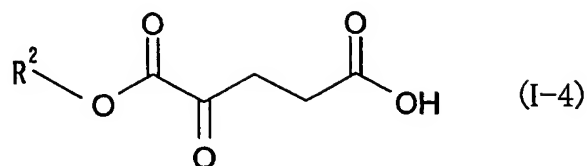


で示される化合物、

【0061】

または、下記式 (I-4) ;

【化16】



(式中、R²は炭素数1～6の低級アルキル基または炭素数2～6の低級アルキルニル基を表す。)

で示される化合物、
が挙げられる。

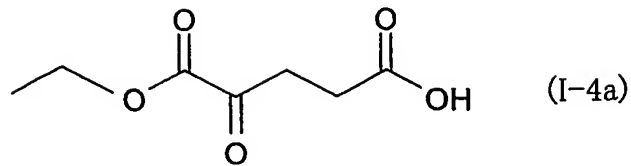
【0062】

式 (I-4) で表される化合物において、置換基 R² は、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、tert-ペンチル基、n-ヘキシル基、1,1-ジメチルプロピル基もしくは3-メチル-3-ブテニル基等の炭素数1～6の低級アルキル基；例えば、ビニル基、アリル基、1-プロペニル基、イソプロペニル基、2-ブテニル基、1,3-ブタジエニル基もしくは2-ペンテニル基等の炭素数2～6の低級アルケニル基である。なかでも、エチル基またはブチル基が好ましく、エチル基が特に好ましい。これら炭素数1～6の低級アルキル基または炭素数2～6の低級アルキルニル基は、化学的に許容される範囲で置換基を有していてもよく、該置換基としては、例えばハロゲン、水酸基、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、カルバモイル基、アルカノイル基、アルカノイルオキシ基またはアルカノイルアミノ基等が挙げられる。

【0063】

前記腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬または皮膚の真皮病変の予防治療薬に含まれる化合物としては、特に、下記式 (I-4a) ;

【化17】



で示される化合物またはその薬理学的に許容される塩が好ましい。

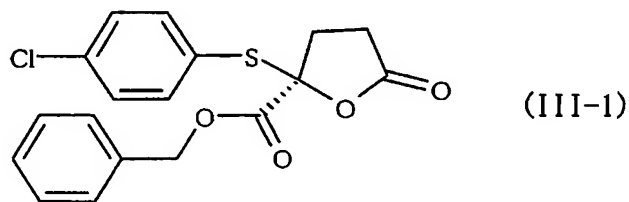
【0064】

前記医薬組成物のさらに他の態様としては、調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導する化合物を含有することを特徴とする腎臓の糸球体病変および尿細管・間質病変の予防または／および治療のための医薬が挙げられる。

前記医薬組成物のさらに他の態様としては、調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導する化合物を含有することを特徴とする皮膚の表皮病変および皮膚の真皮病変の予防または／および治療のための医薬が挙げられる。

これら医薬に含まれる化合物としては、例えば下記式 (III-1)；

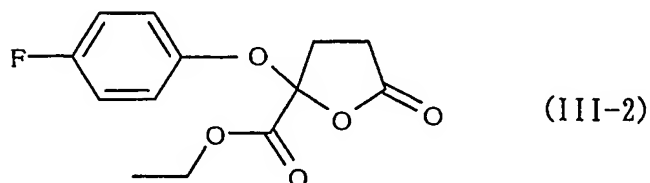
【化18】



で示される化合物、

または、下記式 (III-2)；

【化19】



で示される化合物、

が挙げられる。

【0065】

本発明にかかる医薬に含まれる化合物は、上記化合物の誘導体であってもよい。前記誘導体としては特に限定されないが、例えば上記化合物中の水素原子、特に CH_3 、 CH_2 、 CH 、 NH 、 NH_2 、 COOH または OH における水素原子が当技術分野で用いられる通常の置換基で置換されている化合物が挙げられる。前記置換基としては、ハロゲン（好ましくは、フッ素、塩素、臭素）、オキシ基、アルキル基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、アルカノイル基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、アルカノイルオキシ基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、アルカノイルアミノ基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基（好ましくは $\text{C}_2 \sim 8$ ）、ハロアルキルカルボニル基（好ましくは $\text{C}_2 \sim 8$ ）、アルコキシ基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、ハロアルコキシ基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、アミノ基、アルキルアミノ基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、ジアルキルアミノ基（好ましくは $\text{C}_2 \sim 16$ ）、環状アミノ基、アルキルアミノカルボニル基（好ましくは $\text{C}_2 \sim 8$ ）、カルバモイル基、水酸基、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、アルキルチオ基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、アルキルスルホニルオキシ基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、アルキルスルホニルアミノ基（好ましくは $\text{C}_1 \sim 8$ ）、フェニル基またはベンジル基等が挙げられる。

【0066】

また、前記誘導体としては、上記化合物の還元体や酸化体なども挙げられる。さらに、前記誘導体としては、上記化合物の置換基を他の置換基に変換した化合物なども挙げられる。例えば、ハロゲン元素を他のハロゲン元素に変換した化合物、水酸基をメルカプト基に変換した化合物、エーテル結合をチオエーテル結合に変換した化合物、チオエーテル結合をエーテル結合に変換した化合物、複素環基の酸素原子を窒素原子に変換した化合物または複素環基の窒素原子を酸素原子に変換した化合物などが挙げられる。

【0067】

上記化合物は公知化合物であり、既に知られている方法により容易に製造することができる。また上記化合物の誘導体も、当技術分野で公知の方法により上記化合物から容易に製造することができる。

【0068】

本発明の医薬に含まれる化合物が酸性または塩基性を示す場合は、これら化合物の塩を用いることもできる。該化合物の塩としては、薬理学的に許容される酸（例えば、無機酸、有機酸）、塩基（例えば、無機塩基、有機塩基）またはアミノ酸（例えば、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸）などとの塩が挙げられる。具体的には、本発明の医薬に含まれる化合物が塩基性を示す場合、その塩としては、例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸との塩などの無機酸塩；または例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸との塩などの有機酸塩が挙げられる。この場合、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩など酸性アミノ酸との塩を形成することもできる。本発明の医薬に含まれる化合物が酸性を示す場合、その塩としては、ナトリウムもしくはカリウムなどのアルカリ金属、マグネシウムもしくはカルシウムなどのアルカリ土類金属との塩などの無機塩基との塩；または、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどの有機塩基との塩が挙げられる。この場合、例えばアルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩など塩基性アミノ酸との塩を形成することもできる。

また、前記医薬に含まれる化合物は、プロドラッグであってもよい。

【0069】

本発明は、以上述べてきた本発明にかかる腎臓の糸球体病変の予防治療薬と、本発明にかかる腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬とを併用することを特徴とする腎疾患の予防治療薬を提供する。

前記医薬の使用に際しては、腎臓の糸球体病変の予防治療薬と腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬投与時期は限定されず、投与対象に対し同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。このような投与形態としては、例えば、（１）腎臓の糸球体病変の予防治療薬と腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬と所望により医薬添加剤とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、（２）腎臓の糸球体病変の予防治療薬および所望により医薬添加剤と、腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬および所望により医薬添加剤とを別々に製剤化して得ら

れる 2 種の製剤の同一投与経路での同時投与、(3) 腎臓の糸球体病変の予防治療薬および所望により医薬添加剤と、腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬および所望により医薬添加剤とを別々に製剤化して得られる 2 種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、(4) 腎臓の糸球体病変の予防治療薬および所望により医薬添加剤と、腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬および所望により医薬添加剤とを別々に製剤化して得られる 2 種の製剤の異なる投与経路での同時投与、(5) 腎臓の糸球体病変の予防治療薬および所望により医薬添加剤と、腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬および所望により医薬添加剤とを別々に製剤化して得られる 2 種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与などが挙げられる。

【0070】

本発明は、以上述べてきた本発明にかかる皮膚の表皮病変の予防治療薬と、本発明にかかる皮膚の真皮病変の予防治療薬とを併用することを特徴とする皮膚疾患の予防治療薬を提供する。前記医薬の使用は、上記併用医薬と同様である。

【0071】

本発明にかかる腎臓の糸球体病変の予防治療薬、腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬または腎疾患の予防治療薬は、公知の何れの剤形をとってよく、例えば所望により糖衣を施しまたはフィルムコーティングした錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などの剤形を有し、経口的に投与されるものであってよい。また、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤などの剤形を有し、非経口的に投与されるものであってもよい。上記剤形は、自体公知の方法で製造することができる。

【0072】

本発明にかかる腎臓の糸球体病変の予防治療薬、腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬または腎疾患の予防治療薬は、進行性病変、とくに腎臓の糸球体病変や腎臓の尿細管・間質病変に対して効用のある他の薬理作用成分を含んでいてもよい。

また、本発明にかかる腎臓の糸球体病変の予防治療薬、腎臓の尿細管・間質病変の予防治療薬または腎疾患の予防治療薬は、例えば、香味剤、賦形剤、ペヒク

ル、防腐剤、安定剤、結合剤など当業界で用いられる添加剤を含有していてもよい。錠剤またはカプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントまたはアラビアゴムのような結合剤；結晶性セルロースのような賦形剤；コーンスターチ、ゼラチンまたはアルギン酸などのような膨化剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。剤型がカプセルである場合には、上記添加剤の他、さらに油脂のような液状担体を含有させることができる。

【0073】

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、またはブドウ糖やその他の例えばD-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど補助薬を含む等張液などが用いられる。このとき、例えば、エタノールなどのアルコール；例えば、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールなどのポリアルコール；例えば、ポリソルベート80TM、HCO-50などの非イオン性界面活性剤などの適当な溶解補助剤を併用してもよい。

油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられる。安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどの溶解補助剤を併用してもよい。また、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などを配合してもよい。調製された注射液などの医薬組成物は、通常、適当なアンプルに充填される。

【0074】

本発明にかかる皮膚の表皮病変の予防治療薬、皮膚の真皮病変の予防治療薬または皮膚疾患の予防治療薬（以下、皮膚疾患の予防治療薬等という。）は、上記腎疾患の予防治療薬等と同様の剤形をとることができる。さらに、本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等は、ペースト剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、ゲル状クリーム剤、ローション剤、乳剤、懸濁剤、湿布剤、硬膏剤、リニメント剤、エアゾール剤、シロップ剤、口腔剤、点眼剤または点鼻剤などの剤形をとること

もできる。中でも、本発明の皮膚疾患の予防治療薬等は、外用剤の剤形を有することが好ましい。

【0075】

本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等が軟膏剤の剤形を有する場合、例えば、ワセリン、流動パラフィン、シリコンもしくは植物油などの油脂性基材；例えば、親水ワセリンもしくは精製ラノリンなどの乳剤性基剤；例えば、マクロゴールなどの水溶性基材などの基材に、本発明化合物または薬理学的に許容され得る塩、および所望により、例えば、陰イオン型もしくは非イオン型界面活性剤などの乳化剤またはパラオキシ安息香酸エステル類などの保存剤等の製剤用添加剤を含有することにより本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等を製造することができる。

【0076】

本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等がゲル剤の剤形を有する場合、水にゲル化剤（例、カルボキシビニル重合体、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはアルギン酸プロピレングリコールエステル等）などを加えて得られる基材に、本発明化合物または薬理学的に許容され得る塩、および所望により、例えば、低級アルコール、中和剤、界面活性剤または吸収促進剤などの製剤用添加剤を含有することにより本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等を製造することができる。

【0077】

本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等がクリーム剤の剤形を有する場合、例えば高級脂肪酸エステル類（例：ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、セバシン酸ジエチル、ラウリン酸ヘキシル、イソオクタン酸セチル等）、低級アルコール（例：エタノール、イソプロパノール等）、炭水化物（例：流動パラフィン、スクワラン等）、多価アルコール（例：プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール等）または高級アルコール（例：2-ヘキシルデカノール、セタノール、2-オクチルドデカノール等）等を含む基材に、本発明化合物または薬理学的に許容され得る塩、および所望により、例えば、乳化剤、防腐剤、

吸収促進剤またはかぶれ防止剤などの製剤用添加剤を含有することにより本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等を製造することができる。

また、クリーム剤とゲル剤の中間の性質を有するゲル状クリーム剤とするためには、上記のクリーム剤にゲル化剤および中和剤を加えればよい。

【0078】

本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等が外用液剤の剤形を有する場合、溶剤に、本発明化合物または薬理学的に許容され得る塩、および所望により、例えば、緩衝剤、安定化剤、防腐剤、pH調製剤、溶剤、溶解補助剤、着香剤、ゲル化剤、矯味剤または清涼化剤等などの製剤用添加剤を含有させることにより本発明にかかる皮膚疾患の予防治療薬等を製造することができる。前記溶剤としては、例えばグリセリン、プロピレングリコール、エタノール、イソプロパノール、ブチレングリコール、水、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、ブドウ糖、イプシロンアミノカプロン酸、グリシン、グルタミン酸塩、ヒアルロン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール類、カルボキシビニルポリマー類やセタノール、ステアリルアルコールなどの高級アルコール類、中鎖脂肪酸エステル類やミリスチン酸イソプロピルなどの脂肪酸エステル類、ステアリン酸などの高級脂肪酸、スクワラン、流動パラフィン、白色ワセリンまたは精製ラノリンなどを挙げることができる。

ここで、外用液剤としては、洗浄、注入、湿布、吸入、噴霧、浣腸、塗布、薬浴、清拭、消毒、点眼、洗眼、点耳または点鼻など外用に供する液体製剤が挙げられる。

【0079】

本発明の外用液剤を通常噴射剤と共に用いることによりエアゾール剤を製造することができる。噴射剤としては通常エアゾールに用いられるジメチルエーテル、液化石油ガス、N₂ガス、亜酸化窒素ガス、CO₂ガス、代替フロンガス等を挙げることができる。噴射剤を用いしないで圧縮空気を用いることもできる。また、これらの混合物を用いてもよい。

【0080】

本発明に係る医薬の1日投与量は、対象疾患、投与ルートまたは剤形などによ

り相違するので、一概には言えないが、好ましくは約 $0.1 \sim 100 \text{ mg/kg}$ 程度、さらに好ましくは約 $1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ 程度である。本発明に係る医薬が外用剤である場合、有効成分が $0.01 \sim 10$ 重量%となるように調整されていることが好ましい。

【0081】

本発明は、調節型Tリンパ球と再生促進型マクロファージを誘導する化合物を含有することを特徴とするアポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る硬化病変を抑え、選択的に前記病変を修復再生する化粧料をも提供する。

前記化粧料の一態様として、(a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型Tリンパ球を介さずに再生促進型CD11b+CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする化粧料が挙げられる。なかでも、前記化粧料の好ましい態様としては、ヒト末梢血単核球細胞とリポ多糖類とが接触して惹起される再生促進型CD11b+CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+ Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有する化粧料が好ましい。前記化粧料に含まれる化合物は、上記スクリーニング方法により得ることができる化合物が好ましい。上記したすべての化合物またはその薬理的に許容される塩が本発明の化粧料の有効成分として用いられる。具体的には、上記化合物(II-1)～(II-11)、(II-11a)およびそれらの薬理的に許容される塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などの上記した塩など)が挙げられる。本態様の化粧料は、上述した皮膚の表皮病変の予防治療薬と同一の効能を有するので、皮膚の表皮病変の予防または／および治療のために使用されるのが好ましい。

【0082】

前記化粧料の他の態様として、(a) 調節型CD2-CD4+ Tリンパ球を誘導し細胞障害型マクロファージの産生と機能を抑制し再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させるか、または(b) 調節型リンパ球を介さずに再生促進型CD11b-CD2+マクロファージを優位に増加させる化合物を含有することを特徴とする化粧料が挙げられる。なかでも、前記化粧料の好ましい態様としては、ヒト末梢

血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞とが接触して惹起される再生促進型CD11b-CD2+マクロファージおよび調節型CD2-CD4+Tリンパ球の誘導を促進する化合物を含有することを特徴とする化粧料が好ましい。前記化粧料に含まれる化合物は、上記スクリーニング方法により得ることができる化合物が好ましい。上記したすべての化合物またはその薬理学的に許容される塩が本発明の化粧料の有効成分として用いられる。具体的には、上記化合物 (I-1) ~ (I-4)、(I-4a) およびそれらの薬理学的に許容される塩 (例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などの上記した塩など) が挙げられる。本態様の化粧料は、上述した皮膚の真皮病変の予防治療薬と同一の効能を有するので、皮膚の真皮病変の予防または／および治療のために使用するのが好ましい。

【0083】

前記化粧料のさらに他の態様としては、調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導する化合物を含有することを特徴とする化粧料が挙げられる。前記化粧料に含まれる化合物は、具体的には、上記化合物 (III-1)、(III-2) およびそれらの薬理学的に許容される塩 (例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などの上記した塩など) が挙げられる。当該化粧品は、皮膚の表皮病変および皮膚の真皮病変の予防または／および治療のために使用することが好ましい。

前記化粧料のさらに他の態様としては、上記皮膚の表皮病変の予防または／および治療のために好適な化粧料と、上記皮膚の真皮病変の予防または／および治療のために好適な粧料とを併用することを特徴とする化粧料が挙げられる。当該化粧品は、皮膚疾患の予防または／および治療のために使用することが好ましい。

【0084】

本発明の化粧料には、上記必須成分に加え、必要に応じて通常化粧料に配合される成分を含有してもよい。配合成分としては、例えば、油性成分、保湿剤、エモリエント剤、紫外線吸収剤、酸化防止剤、界面活性剤、防腐剤、複合脂質、活性酸素消去作用を有する物質、抗炎症作用物質、ビタミンおよびその誘導體類、血行促進剤、抗脂漏剤、有機および無機顔料、皮膚に対して何らかの好ましい作用を示すことが期待される植物抽出物、動物性抽出物、微生物由来成分もしくは

藻類抽出物、増粘剤、アミノ酸類、コレステロール類、植物ステロール類、リポ蛋白質類、色素、pH調整剤、香料、冷感剤、制汗剤、殺菌剤、肌柔軟剤、水等を挙げることができ、本発明の目的、効果を損なわない質的、量的範囲内で含有可能である。

【0085】

油性成分としては、アボガド油、パーム油、ピーナツ油、牛脂、コメヌカ油、米胚芽油、ホホバ油、エステル油、シリコン油、カルナウバロウ、ラノリン、流動パラフィン、スクワラン、オキシステアリン酸、イソステアリン酸、イソステアリルアルコール、セチルアルコール、ヘキサデシルアルコール等を挙げることができる。

保湿剤としては、グリセリン、1,3-ブチレングリコール、ソルビトール、ポリエチレングリコール、コラーゲン、ヒアルロン酸およびその塩、コンドロイチン酸およびその塩、キチン、キトサン等を挙げることができる。

エモリエント剤としては、例えば、長鎖アシルグルタミン酸コレステリルエステル、ヒドロキシステアリン酸コレステリル、12-ヒドロキシステアリン酸、ステアリン酸、ロジン酸、ラノリン脂肪酸コレステリルエステル等を挙げることができる。

紫外線吸収剤としては、例えば、パラジメチルアミノ安息香酸アミル、ウロカニン酸、ジイソプロピルケイ皮酸エチル等を挙げることができる。

酸化防止剤としては、例えば、エリソルビン酸ナトリウム、パラヒドロキシアニソール等を挙げることができる。

界面活性剤としては、例えば、ステアリル硫酸ナトリウム、セチル硫酸ジエタノールアミン、セチルトリメチルアンモニウムクロライド、イソステアリン酸ポリエチレングリコール、ステアリン酸グリセリン等を挙げることができる。

防腐剤としては、例えば、エチルパラベン、プチルパラベン等を挙げることができる。

複合脂質としては、例えば、グリセロリン脂質、スフィンゴリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質等を挙げることができる。

【0086】

活性酸素消去作用を有する物質としては、例えば、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、 β -カロチン、油溶性甘草根抽出物、グラブリジン、リコカルコンA、バイカリン、バイカレイン、イチヨウ葉抽出物、クジン抽出物、ハマメリス抽出物、黄杞抽出物等を挙げることができる。

抗炎症作用物質としては、例えば、アラントイン、グアイヤアズレン、カマズレン、ピサボロール、グリチルリチン酸およびその塩、グリチルレチン酸およびその誘導体、ステアリルイプシロンイミノカプロン酸、インドメタシン、酸化亜鉛、ヒノキチオール等を挙げることができる。

ビタミンおよびその誘導体類としては、例えば、レチノール、レチナール、レチン酸、パントテン酸、パンテノール、リボフラビン、ピリドキシン、トコフェロール、アスコルビン酸、葉酸、ニコチン酸等を挙げることができる。

血行促進剤としては、例えば、 γ -オリザノール、デキストラン硫酸ナトリウム等を挙げることができる。

抗脂漏剤としては、例えば、硫黄、チアントール等を挙げることができる。

【0087】

有機および無機顔料としては、例えばケイ酸、無水ケイ酸、ケイ酸マグネシウム、タルク、セリサイト、マイカ、カオリン、ベンカラ、クレー、ベントナイト、チタン被膜雲母、オキシ塩化ビスマス、酸化ジルコニウム、酸化マグネシウム、酸化亜鉛、酸化チタン、酸化アルミニウム、硫酸カルシウム、硫酸バリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、酸化鉄、群青、酸化クロム、水酸化クロム、カラミンおよびカーボンプラックおよびこれらの複合体等の無機粉体；ポリアミド、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリウレタン、ビニル樹脂、尿素樹脂、フェノール樹脂、フッ素樹脂、ケイ素樹脂、アクリル樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、ポリカーボネート樹脂、ジビニルベンゼン・スチレン共重合体、シルクパウダー、セルロース、CIピグメントイエロー、CIピグメントオレンジ等の有機粉体；およびこれらの無機粉体と有機粉体の複合粉体等を挙げることができる。

皮膚に対して何らかの好ましい作用を示すことが期待される植物抽出物、動物性抽出物、微生物由来成分または藻類抽出物としては、例えば、アルニカ抽出物

、インチンコウ抽出物、オウゴン抽出物、オウバク抽出物、オウレン抽出物、カミツレ抽出物、カンゾウ根水抽出物、サンシシ抽出物、シコン抽出物、シャクヤク抽出物、ボタンピ抽出物、ジュウヤク抽出物、シラカバ抽出物、西洋トチノキ種子抽出物、トウキンセンカ抽出物、ボタンピ抽出物、ムクロジ抽出物、シナノキ抽出物、ローズマリー抽出物、セイヨウノコギリ草抽出物、ヨモギ抽出物、岩白菜抽出物、ヨクイニン抽出物、アロエ抽出物、ビワ抽出物、モモ抽出物、センキュウ抽出物、セージ抽出物、トウキ抽出物、ヘチマ抽出物、セイヨウボダイジュ抽出物、オタネニンジン抽出物、トウガラシ抽出物、甜茶抽出物、茶抽出物、オトギリソウ抽出物、マロニエ抽出物、プルーン抽出物、コラーゲン、加水分解コンキオリン、エラスチン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、プラセンターエキス、ローヤルゼリー、ビフィズス菌培養物、乳酸菌培養物、酵母エキス、レイシ菌糸体抽出物、ブクリョウ抽出物、褐藻抽出物、紅藻抽出物、緑藻抽出物等を挙げることができる。

増粘剤としては、例えばカルボキシビニルポリマーを挙げることができる。

防腐剤としては、例えばメチルパラベン等を挙げることができる。

【0088】

本発明の化粧料は、溶液、乳化物、練り状混合物等の形態をとることが可能である。具体的には、本発明の化粧料には、洗顔クリーム、洗顔フォーム、クレンジングクリーム、クレンジングミルク、クレンジングローション、マッサージクリーム、コールドクリーム、モイスチャークリーム、乳液、化粧水、パック、ファンデーション、アフターシェービングクリーム、日焼け止めクリーム、日焼け用オイル、ボディシャンプー、ヘアシャンプー、ヘアリンス、ヘアトリートメント、養毛料、育毛料、チック、ヘアクリーム、ヘアリキッド、セットローション、ヘアスプレー、ヘアダイ、ヘアブリーチ、カラーリンス、カラスプレー、パーマネントウェーブ液、プレスパウダー、ルースパウダー、アイシャドー、ハンドクリーム等が含まれる。

【0089】

本発明の化粧料の使用方法は年齢、個人、使用する部位により異なるが、有効成分の濃度が0.01～10重量%程度、好ましくは0.1～5重量%程度であ

るものを1日1回～数回、皮膚に塗布することが望ましいがこれに限定されるものではない。

【0090】

【実施例】

＜実施例1 調節型CD2-CD4+Tリンパ球の産生誘導する化合物＞

方法は、上記スクリーニング方法Cに従って行った。ただし、正常ヒトの末梢血から単球monocyte分画と同時に同じTリンパ球分画を得た。細胞障害型マクロファージの誘導は、単球monocyte分画にマイトジェンを添加することなく6日間培養して誘導した。式(III-1)で示される化合物はエタノールを溶媒にして溶解し、培養開始時の最終濃度を $10\mu\text{g/ml}$ から $0.1\mu\text{g/ml}$ までの3段階としてTリンパ球分画に培養開始時に添加し同様に6日間培養した。培養終了後に、付着細胞を含めて単球およびTリンパ球を採取した。

式(III-1)で示される化合物で処理した培養Tリンパ球のなかに細胞障害型マクロファージによるSPFC活性を阻害する調節型Tリンパ球が産生されているかを判定するために、SPFC法において、上記単層化した自己赤血球付着したTerasakiプレートのwellに約 1×10^4 個の培養単球を添加し、同時に、5倍数の式(III-1)で示される化合物で処理した培養Tリンパ球を加えた。37℃程度で約2時間静置した。

【0091】

結果は、表1に示すように、 $0.1\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度でTリンパ球を処理することで、細胞障害型マクロファージの活性を50%以上の抑制を示した。

ヒトTリンパ球のうち、自己赤血球とロゼット形成能を有するautorosette-forming T lymphocytes (ARFC-T) lymphocyteの細胞表面マーカーはCD2+であり、non-autorosette-forming T lymphocytes (non-ARFC-T) はCD2-である。non-ARFC-Tは細胞増殖活性を有することからCD4+が推察される。

以上より、式(III-1)で示される化合物は細胞障害型マクロファージの誘導に選択性を示さない化合物であるが、調節型CD2-CD4+Tリンパ球を誘導する。

【0092】

【表1】

表1. IT 130化合物添加による調節型Tリンパ球の誘導

化合物(III-1)を 末梢血Tリンパ球に添加し 6日間培養	細胞障害型マクロファージによるSPFC assay 37°C 2時間 反応	標的: 自己赤血球 細胞障害型マクロファージ 106個あたりの 標的自己赤血球に対する SPFC陽性細胞数	抑制率 (%) $= \frac{1 - \text{[化合物(III-1)処理Tリンパ球を添加したときのSPFC陽性細胞数/溶媒処理Tリンパ球を添加したときのSPFC陽性細胞数]} \times 100}{1}$
ヒト末梢血Tリンパ球に 添加する 化合物(III-1)の濃度	細胞障害型マクロファージに対して培養Tリンパ球を 1:5の比率で添加		
	細胞障害型マクロファージ単独	3800	
溶媒エタノール添加	細胞障害型マクロファージ + 溶媒処理Tリンパ球	2600	—
化合物(III-1): 10 μ g/ml	細胞障害型マクロファージ + 化合物(III-1) 10 μ g/ml濃度処理Tリンパ球	200	92.3
化合物(III-1): 1 μ g/ml	細胞障害型マクロファージ + 化合物(III-1) 1 μ g/ml濃度処理Tリンパ球	1200	53.8
化合物(III-1): 0.1 μ g/ml	細胞障害型マクロファージ + 化合物(III-1) 0.1 μ g/ml濃度処理Tリンパ球	800	69.2

【0093】

<実施例 2>

動物実験における病変選択的な免疫調節再生促進型細胞のうち再生促進型マクロファージの誘導効果を示す化合物の評価—14日間一側尿管完全閉塞後の閉塞解除モデルを用いた検討

【0094】

方法 I

8-9週齢、約280gのSDラット雄を用いて、石橋が考案確立した方法（石橋道男ほか：日本腎臓学会誌42：248，2000）により実験モデルを作成した。すなわち、ラットをエーテル麻酔下にて開腹し左腎下極の高さで尿管を7-0ナイロンで結紮閉腹した。閉塞14日目に閉塞を解除しカフを用い尿路を再建した。すなわち、14日後に結紮された閉塞尿管を部分切除し、25ゲージポリエチレンチューブ（日本シャーウッド製）をカフとして、下方正常尿管断端より内腔に挿入留置し、次に上方の拡張した尿管内にもカフを留置し、それぞれ7-0ナイロンにて結紮固定し尿路を再建した。同時に、対側の右腎を摘出した。閉塞解除後に体重を測定し、解除後2日目、5日目および7日目に採血して血清クレアチニンを測定し、7日目には麻酔のもと犠死させ、左閉塞解除腎を摘出した。

【0095】

摘出した腎について腎重量の測定、腎機能の指標として血漿中のクレアチニン濃度mg/dlの測定、腎病理形態学的検査に加え、閉塞解除腎に浸潤する白血球細胞についてED1マクロファージ、CD11b(ED8)陽性マクロファージ、CD5陽性リンパ球についての細胞表面マーカーを用いて免疫病理学的検討を行った。陽性細胞数の記載は、5個の糸球体に存在した陽性数を測定し糸球体1ヶあたりの細胞数、尿細管・間質については200倍視野に存在する細胞数を5ヶ所選りその総和の細胞数とした。マクロファージについては、糸球体にあるCD11b陽性細胞数はCD11b+CD2+マクロファージとして糸球体1個あたり1個以上の陽性細胞例を陽性とした。尿細管・間質ではCD11b陽性数が60個以下になった例をCD11b-CD2+マクロファージが優位に増加した例と判定した。

【0096】

このモデルにおいて、下記のように本発明に係る化合物を投与しない場合は、2週間完全閉塞期間中と閉塞解除後の経時的な病理形態学的検討において、尿細管・間質病変を主体に腎構造の線維化、萎縮をきたすものが閉塞解除により再生腎増大を呈し修復の過程を伴う。閉塞期間中にみられる細胞浸潤としてはCD5陽性T細胞の増加はマクロファージほど著明ではなく、ED1陽性マクロファージが10日目に優位となる。

糸球体病変については、ボーマン嚢壁肥厚と糸球体硝子化を呈する糸球体を数え有病変糸球体の比率を求めた。尿細管・間質病変は尿細管基底膜の肥厚と間質の繊維化を定量化して病変の程度を表した。

【0097】

方法II

試験管内において、リボ多糖類とヒト末梢血単核球細胞を接触させることにより惹起されることを特徴とする腎臓の糸球体病変を選択的に傷害する細胞障害型マクロファージの産生を阻害する化合物(以下、II群化合物という)群として、式(II-1)で示される化合物および式(II-2)で示される化合物が公知のものとして存在する。

また、試験管内において、ヒト末梢血単核球細胞とマイトマイシン処理ヒト末梢血単核球細胞を接触させることを特徴とする腎臓の尿細管・間質病変を選択的に傷害する細胞障害型マクロファージの産生を阻害する化合物(以下、I群化合物という)群として式(I-1)で示される化合物が公知のものとして存在する。

【0098】

このモデルを用いて、本発明に係る γ -ラクトン誘導体のin vivoの生物学的な効果を検討した。被検化合物は、アラビアゴムとともに被検化合物の原末を滅菌生理食塩水に溶解し、アラビアゴムは5%、被検化合物は30mg/mlに調整した。連日30mg/kgおよび3mg/kgを経口および皮下注射した。14日間の閉塞期間と7日間の閉塞解除の21日間連日投与した。

なお、被検化合物としては、I群のallo-MLC刺激によるSPFC産生を抑制する化合物、すなわちallo-MLC存在下におけるエフェクターマクロファージの誘導を選択的に抑制する化合物として、式(I-1)で示される化合物を用い、II群

の L P S 刺激による S P F C 産生を抑制する化合物、すなわち L P S 存在下におけるエフェクターマクロファージの誘導を選択的に抑制する化合物として式 (II-1) で示される化合物および式 (II-2) で示される化合物を用いた。

実験群としては、単独投与群、両群を併用した群およびアラビアゴムの溶媒投与の対照群を設け、腎機能、形態的な評価に加えて、免疫病理学的方法により ED1、CD5、CD11b 陽性細胞数を比較した。

【 0 0 9 9 】

その結果を表 2 に示す。

【表2】

実験群	化合物	系球体病変再生 CD11b+CD2+Mφ数		尿細管・間質病変再生 CD11b-CD2+Mφ数		2種類の 再生Mφ 陽性一致	系球体病変		尿細管・間質病変		血清 クレア チニン mg/dl
		系球体1個 あたりの 陽性細胞数	判定: 増加 +	5視野(×200倍) あたりの 陽性細胞数	判定: 増加 +		病変系球体 の割合(%)	判定: 病変の改善 有り+なし-	病変の程度 (定性)	判定: 病変の改善 有り+なし-	
化合物 対照群 5%アラビアゴム		動物 番号									
		407	0.0	-	-	18	+	+	9.0	+	2.2
		408	0.8	-	-	141	-	-	9.0	-	3.8
		409	1.8	+	+	86	-	-	10.0	-	1.9
		410	1.2	+	+	64	-	-	11.0	-	3.0
		506	0.3	-	-	16	+	+	7.5	+	2.2
I群化合物 (I-1) 30mg/kg 皮下		508	2.3	+	+	73	-	-	9.5	-	2.1
		401	0.5	-	-	24	+	+	7.0	+	3.0
		402	2.0	+	+	140	-	-	4.0	+	2.7
		403	0.0	-	-	59	+	+	3.0	+	2.8
		404	1.3	+	+	41	+	+	3.0	+	2.2
		501	1.2	+	+	39	+	+	7.5	-	2.6
II群化合物 (II-1) 30mg/kg 皮下		502	1.7	+	+	49	+	+	9.0	-	1.7
		503	1.1	+	+	15	+	+	9.0	-	1.7
		504	2.8	+	+	65	-	-	8.0	-	2.0
		505	2.0	+	+	26	+	+	6.5	-	1.8
		601	0.7	-	-	33	+	+	4.5	-	2.0
		602	1.7	+	+	35	+	+	6.5	-	2.5
II群化合物 (II-2) 30mg/kg 皮下		603	2.3	+	+	27	+	+	4.5	-	2.0
		604	1.4	+	+	16	+	+	6.5	-	2.3
		1101	0.4	-	-	1	+	+	3.0	+	2.3
		1102	1.3	+	+	17	+	+	5.0	-	2.0
		1103	3.1	+	+	37	+	+	2.0	+	2.9
		1105	1.0	+	+	34	+	+	2.5	+	2.6
I群化合物 (I-1) 30mg/kg 経口 + II群化合物 (II-1) 3mg/kg 皮下		1106	1.5	+	+	7	+	+	4.5	-	1.8
		1202	1.2	+	+	37	+	+	2.0	+	1.3
		1203	1.5	+	+	20	+	+	0.5	+	2.2
		1204	1.8	+	+	21	+	+	0.5	+	1.4
		1206	1.8	+	+	16	+	+	0.5	+	1.9

【0100】

対照群において、糸球体内に再生促進型CD11b+CD2+マクロファージ、尿細管・間質病変に再生促進型CD11b-CD2+マクロファージが、存在することがわかる。し

病変再生マクロファージ(Mφ)陽性細胞の判定:糸球体1個あたり1細胞数以上、尿細管・間質病変あたり60細胞数以下をそれぞれ陽性+とした。
尿細管・間質病変の程度の判定スコア:++は2, +++は3とした。
糸球体病変の改善は病変系球体数の割合が40%以下に減少したもの、尿細管・間質病変は病変の程度が4以下を呈したものとした。

かしながら、それぞれの病変に認められた再生促進型マクロファージがともに増加する一致した応答を示した動物は対照群には存在していないことが重要な結果として注目される。対照群における病変の程度は、糸球体の54%から83%に病変が認められ、尿細管・間質病変も尿細管基底膜の肥厚と間質の繊維化が定性7.5から11のレベルに認められた。

【0101】

まず、治療群I群化合物である式(I-1)で示される化合物は、公知の化合物であり選択的に尿細管・間質病変をきたす細胞障害型マクロファージの誘導を阻害するものとして知られている。このI群化合物である式(I-1)で示される化合物による選択的な、すなわち尿細管・間質病変に対する病変修復再生CD11b-CD2+マクロファージが誘導されているかをみると、4例中3例が尿細管・間質病変に対する再生促進型マクロファージが増加している一方、糸球体病変の再生促進型マクロファージは4例中2例と対照群の場合に比して変わりなかった。病理学的な病変の改善については、尿細管・間質病変のみが4例中3例に改善し糸球体病変には改善がなかった。血清クレアチニンには差がなかった。

【0102】

治療群II群化合物である式(II-1)で示される化合物とII群化合物である式(II-2)で示される化合物は、公知の化合物であり選択的に尿細管・間質病変をきたす細胞障害型マクロファージの誘導を阻害するものとして知られている。II群化合物である式(II-1)で示される化合物の治療群をみると、糸球体病変の再生促進型CD11b+CD2+マクロファージの増加が5例中すべてに認められたのに加えて、尿細管・間質病変の修復再生CD11b-CD2+マクロファージも5例中4例に増加していた。II群化合物はI群化合物と異なり他の病変を修復再生するマクロファージが誘導されていた。病理学的な病変の改善については、糸球体病変も5例中4例に改善を示し、尿細管・間質病変には改善はなく選択性がみられた。

【0103】

II群化合物である式(II-2)で示される化合物投与群の効果は、II群化合物である式(II-1)で示される化合物と同様で、再生促進型マクロファージは双方の病変にも増加しており、病変の改善もII群化合物である式(II-1)で示さ

れる化合物と同様な糸球体病変の改善に選択性を示した。

以上の結果については、I群化合物である式(I-1)で示される化合物については再生促進型マクロファージの誘導と病変の改善が一致し選択性が認められるが、II類化合物の二種類では、糸球体病変の改善とに選択性の相関が見られるのに、糸球体病変と尿細管・間質病変の再生促進型マクロファージの誘導には相関がなかった。それで、CD87、すなわち、uPAR (receptor of urokinase plasminogen activator) についての表現型の違いが考えられ、糸球体病変の再生促進型マクロファージではCD11b-CD2+CD87-であり、尿細管・間質病変の再生促進型マクロファージではCD11b-CD2+CD87+の可能性が考えられる。

【0104】

さらに、上記の結果を踏まえI群化合物とII群化合物を併用した場合には、糸球体病変と尿細管・間質病変に選択性がより明確になるかを検討した。

I群化合物である式(I-1)で示される化合物を経口投与としII群化合物である式(II-1)で示される化合物を10倍少ない量で皮下中した併用群、そして、II群化合物である式(II-2)で示される化合物を経口投与としI群化合物である式(I-1)で示される化合物を10倍少ない量で皮下中した併用群、のふたつの実験群では、糸球体病変、尿細管・間質病変への両病変にみられる再生促進型マクロファージの一致例は9例中8例と増え、しかも糸球体病変と尿細管・間質病変双方の改善も糸球体病変は全例、尿細管・間質病変は9例中7例に改善が示された。とくにII群化合物である式(II-2)で示される化合物を経口投与としI群化合物である式(I-1)で示される化合物を10倍少ない量で皮下中した併用群にその効果が優れていた。

【0105】

〔製剤例1〕

錠剤

(1) 化合物 (I-1)	10 g
(2) 乳糖	90 g
(3) トウモロコシ澱粉	29 g
(4) ステアリン酸マグネシウム	<u>1 g</u>

130g

成分(1)、(2)及び24gの成分(3)を水と共に混和して顆粒化し、この顆粒に5gの成分(3)と成分(4)を加えて混和し、混合物を圧縮錠剤機で圧縮し、錠剤1錠当たり成分(1)を10mg含有する直径7mmの錠剤1000個を製造する。

【0106】

〔製剤例2〕

化合物(I-1)の代わりに、化合物(II-1)を用いて前記と同様に錠剤を製造する。

【0107】

〔製剤例3〕

カプセル剤

(1) 化合物(I-1)	50mg
(2) 乳糖	14mg
(3) トウモロコシ澱粉	29mg
(4) ヒドロキシプロピルセルロース	6mg
(5) <u>ステアリン酸マグネシウム</u>	<u>1mg</u>

1カプセルあたり 100mg

上記の成分(1)、(2)、(3)、(4)を混和した後、常法に従って顆粒化する。これに成分(5)を加え、常法に従ってゼラチンカプセルに封入し、カプセル剤とする。

【0108】

〔製剤例4〕

化合物(I-1)の代わりに、化合物(II-1)を用いて前記と同様にカプセル剤を製造する。

【0109】

〔製剤例5〕

乳液

(処方)

(1) スクワラン 5.0重量%、(2) 白色ワセリン 2.0重量%、(3) ミツロウ 0.5重量%、(4) ソルビタンセスキオレエート 0.8重量%、(5) ポリオキシエチレンオレイルエーテル (20EO) 1.2重量%、(6) パラオキシ安息香酸メチル 0.1重量%、(7) プロピレングリコール 5.0重量%、(8) 精製水 全量が100となる量、(9) カルボキシビニルポリマー 1.0重量%水溶液 20.0重量%、(10) 水酸化カリウム 0.1重量%、(11) エタノール 5.0重量%、(12) 香料 0.2重量%、(13) ヒアルロン酸ナトリウム 0.3重量%、(14) 化合物(I-4a)のナトリウム塩 0.5重量%

(製法)

(1) ~ (5) の油相成分を混合し75℃に加熱して溶解後、均一化する。一方(6) ~ (8) の水相成分を混合、溶解して75℃に加熱し、油相成分を添加して予備乳化する。(9) を添加した後ホモミキサーにて均一に乳化し、(10) を加えてpHを調整する。冷却後40℃にて(11) ~ (14) を添加、混合、均一化する。

【0110】

〔製剤例6〕

化粧水

(処方)

(1) エタノール 10.0重量%、(2) 1,3-ブチレングリコール 5.0重量%、(3) 化合物(II-11a)のナトリウム塩 0.1重量%、(4) 牛胎盤抽出物 0.1重量%、(5) 香料 0.1重量%、(6) 精製水 84.7重量%

(製法)

(1) ~ (5) を順次(6) に添加して均一に混合、溶解する。

【0111】

〔製剤例7〕

皮膚用クリーム

(処方)

(1) ミツロウ 6.0重量%、(2) セタノール 5.0重量%、(3) 還元
ラノリン 8.0重量%、(4) スクワラン 27.5重量%、(5) グリセリ
ル脂肪酸エステル 4.0重量%、(6) 親油型グリセリルモノステアリン酸エ
ステル 2.0重量%、(7) ポリオキシエチレン (20EO) ソルビタンモ
ノラウリン酸エステル 5.0重量%、(8) プロピレングリコール 5.0重
量%、(9) パラオキシ安息香酸メチル 0.1重量%、(10) 精製水 36
.7重量%、(11) 化合物 (I-4a) のナトリウム塩 0.5重量%、(1
2) 乳酸 0.2重量%

(製法)

(1) ~ (7) の油相成分を混合、溶解して75℃に加熱する。一方、(8)
~ (10) の水相成分を混合、溶解して75℃に加熱する。次いで、上記水相成
分に油相成分を添加して予備乳化した後、ホモミキサーにて均一に乳化し、冷却
後40℃にて(11)、(12)を添加、混合する。

【0112】

〔製剤例8〕

乳液状ファンデーション

(処方)

(1) ステアリン酸 2.0重量%、(2) スクワラン 5.0重量%、(3)
ミリスチン酸オクチルドデシル 5.0重量%、(4) セタノール 1.0重量
%、(5) デカグリセリルモノイソパルミチン酸エステル 9.0重量%、(6)
1,3-ブチレングリコール 6.0重量%、(7) 水酸化カリウム 0.1
重量%、(8) パラオキシ安息香酸メチル 0.1重量%、(9) 精製水 53
.3重量%、(10) 酸化チタン 9.0重量%、(11) タルク 7.4重量
%、(12) ベンガラ 0.5重量%、(13) 黄酸化鉄 1.1重量%、(1
4) 黒酸化鉄 0.1重量%、(15) 香料 0.1重量%、(16) 化合物
(II-11a) のナトリウム塩 0.15重量%、(17) 2-ヒドロキシ酢
酸 0.15重量%、

(製法)

(1) ~ (5) の油相成分を混合し、75℃に加熱して均一とする。一方(6

) ~ (9) の水相成分を混合し、75℃に加熱、溶解して均一とし、これに (10) ~ (14) の顔料を添加しホモミキサーにて均一に分散させる。この水相成分に前記油相成分を添加し、ホモミキサーにて均一に乳化した後冷却し、40℃にて (15) ~ (17) を添加、混合する。

【0113】

【発明の効果】

実施例の結果から、本来、腎臓における病変の場合には糸球体病変と尿細管・間質病変それぞれに対応する再生促進型マクロファージが存在し、糸球体の硬化、尿細管・間質の萎縮、繊維化などの進行性病変をもたらす機序を阻止する機構が存在することを知見した。

選択的に糸球体病変または尿細管・間質病変に誘導される細胞障害型マクロファージの産生を阻害する化合物を動物実験にて効果を検討したところ、対応する病変に選択的な再生促進型マクロファージを誘導できる作用を併せ持つ化合物であることが判明した。

【0114】

これら化合物の投与実験であきらかになったことは、腎臓全体の病変を改善するためには、糸球体病変と尿細管・間質病変双方に一致した細胞障害型マクロファージを調整型Tリンパ球の誘導により選択的に抑制し、同時に再生促進型マクロファージを局所病変へ選択的に誘導するという合目的な免疫応答の制御が必要であることを知見した。そして、糸球体病変と尿細管・間質病変それぞれに薬効をもつ化合物を併用して腎疾患を治療する方法を知見した。

このように、本発明は、調節型Tリンパ球を誘導し、選択的な病変特有の再生促進型マクロファージを誘導する化合物をスクリーニングできる方法を提供できる。そして、スクリーニングによりえられた化合物は、病変の改善のために細胞障害型マクロファージの選択的な抑制も同時に行うものであることが好ましい。

【0115】

進行性病変における細胞障害のメカニズムおよび組織の修復・再生のメカニズムの考察から、腎臓の糸球体病変の修復と再生に関与するCD11b+CD2+マクロファージが皮膚表皮細胞の修復・再生にも関与し、腎臓の尿細管・間質病変の修復と

再生に関与するCD11b-CD2+マクロファージが皮膚真皮細胞の修復・再生にも関与するという思いがけない知見を得た。かかる知見に基づき、本発明は、皮膚表皮病変の予防治療効果を有する医薬もしくは化粧品、および皮膚真皮病変の予防治療効果を有する医薬もしくは化粧品を提供する。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、臓器組織障害に対して病変選択的な再生促進型免疫担当細胞を誘導することによって病変選択的に修復と再生をもたらす予防または/および治療するための医薬を提供することを目的とする。

【解決手段】 調節型Tリンパ球と再生促進型マクロファージを誘導する化合物を含有することを特徴とするアポトーシス死、変性、線維化と萎縮に至る硬化病変を抑え、選択的に前記病変を修復再生する医薬組成物。

【選択図】 なし

特願 2003-159975

出願人履歴情報

識別番号

[500138054]

1. 変更年月日

2000年 3月28日

[変更理由]

新規登録

住所

大阪府堺市庭代台4丁25番16号

氏名

石橋 道男